

COLONIZACIÓN BACTERIANA NASOFARÍNGEA EN LACTANTES HOSPITALIZADOS  
POR BRONQUIOLITIS CAUSADA POR EL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL

TESIS DOCTORAL 2015  
María del Carmen Suárez Arrabal



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

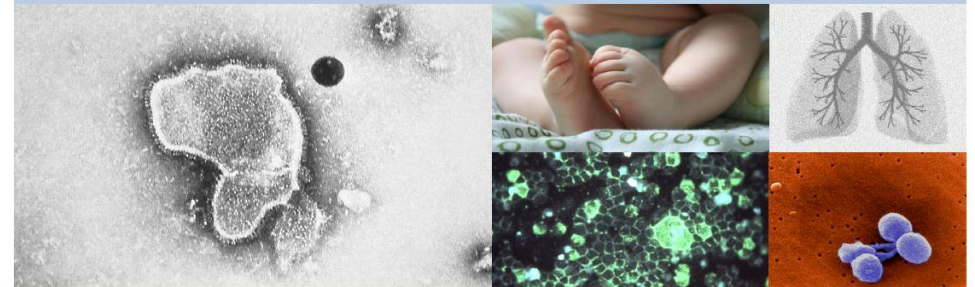


UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Universidad de Málaga  
Facultad de Medicina  
Departamento de Farmacología y Pediatría

## TESIS DOCTORAL

# COLONIZACIÓN BACTERIANA NASOFARÍNGEA EN LACTANTES HOSPITALIZADOS POR BRONQUIOLITIS CAUSADA POR EL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL



MARÍA DEL CARMEN SUÁREZ ARRABAL

2015

Directores:

M<sup>a</sup> Asunción Mejías Montijano

Francisco Javier Pérez Frías



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y PEDIATRÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**“Colonización Bacteriana Nasofaríngea en Lactantes Hospitalizados por  
Bronquiolitis Causada por el Virus Respiratorio Sincitial”**

Dña. María del Carmen Suárez Arrabal

Directores:

Dra. M<sup>a</sup> Asunción Mejías Montijano

Dr. Francisco Javier Pérez Frías

Málaga, noviembre de 2015



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: María del Carmen Suárez Arrabal

 <http://orcid.org/0000-0002-0387-6978>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



PROF. DR. FRANCISCO JAVIER PÉREZ FRÍAS, CATEDRÁTICO DE PEDIATRÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, Y DRA. M<sup>a</sup> ASUNCIÓN MEJÍAS MONTIJANO, PROFESORA ASOCIADA DE OHIO STATE UNIVERSITY, INVESTIGADORA PRINCIPAL DEL CENTRO DE VACUNAS E INMUNOLOGÍA Y MÉDICO ADJUNTO DE LA DIVISIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS PEDIÁTRICAS EN NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL, COLUMBUS, OHIO, ESTADOS UNIDOS.

CERTIFICAN: Que el presente trabajo titulado **“Colonización bacteriana nasofaríngea en lactantes hospitalizados por bronquiolitis causada por el virus respiratorio sincitial”**, y que constituye la Memoria que presenta la Licenciada María del Carmen Suárez Arrabal para optar al grado de Doctor, ha sido realizado en el Departamento de Farmacología y Pediatría de la Universidad de Málaga bajo nuestra dirección. Asimismo, en el marco del proceso de evaluación requerido, autorizamos la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Málaga, a 10 de noviembre de 2015.

Prof. Dr. Francisco Javier Pérez Frías

Dra. M<sup>a</sup> Asunción Mejías Montijano



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

***“El único verdadero viaje de descubrimiento consiste no en  
buscar nuevos paisajes, sino en mirar con nuevos ojos”.***

**(Marcel Proust)**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## AGRADECIMIENTOS

Después de varios años entregada a este apasionante proyecto, al fin llega el momento de que su mayor fruto, esta Tesis Doctoral, vea la luz. En este momento me invade una gran emoción y un sentimiento de inmenso agradecimiento a todas las personas que, de una manera u otra, han contribuido a la concepción, desarrollo, evolución y/o desenlace de este trabajo. Esta Tesis Doctoral está dedicada a todas ellas.

Creo que educar y enseñar es un acto de amor, y por ello quiero agradecer profundamente a todos los profesores y compañeros de profesión que he tenido durante mi vida, los cuales me transmitieron generosamente lo que sabían y me hicieron llegar hasta donde estoy y ser la persona y médico que soy hoy.

Quiero recordar a mis compañeros, residentes y adjuntos, del Servicio de Pediatría del Hospital San Pedro de Logroño, por enseñarme sobre la Pediatría, sobre el trabajo en equipo y sobre la vida. En especial, gracias a las Dras. Marisa Poch, Yolanda Ruiz y Caridad Garijo, por su amistad y por su apoyo.

Gracias al Dr. Javier Pérez Frías, director de esta tesis, por haber confiado en mí durante todos estos años, desde que le hablé de mis sueños por ir a EE.UU. y de mi deseo de realizar la Tesis Doctoral, por animarme a ambas cosas y hacer posible la finalización de este proyecto.

Gracias de corazón a los Dres. Asunción Mejías y Octavio Ramilo, quienes me dieron la oportunidad de mi estancia y formación en EE.UU., en la que aprendí tantísimo, me apasioné por la investigación y viví una experiencia personal y profesional que me cambiaría para siempre. Al Dr. Octavio Ramilo, porque me hizo el mejor regalo de cumpleaños en octubre de 2009, un papel con un mapa de EE.UU. dibujado por su mano donde me explicaba dónde se encontraba Columbus-Ohio, su dirección de email y una invitación para trabajar con él y su equipo. Gracias por sus palabras inspiradoras, su contagiosa pasión por el trabajo y por apoyar incondicionalmente a los jóvenes infectólogos de Europa. Muy especialmente, gracias a la Dra. Asunción Mejías, mi mentora y directora de esta tesis, quien me acogió

primero en su casa, en mis duros primeros días en EE.UU., y luego bajo su ala en el campo de la investigación pediátrica, para más tarde enseñarme a volar. Nunca olvidaré ambas cosas. Admiro su enorme capacidad para el trabajo, su incansable búsqueda de la excelencia y su ilusión por los pequeños descubrimientos del día a día. Por confiarme este trabajo, por su generosidad y su paciencia conmigo durante todos estos años, por enseñarme análisis estadístico, el arte de escribir artículos, a realizar un proyecto de investigación y ayudarme a concluir la Tesis Doctoral: mil gracias. Espero que se sienta orgullosa de mi trabajo y al recordarme se le dibuje siempre una sonrisa.

Gracias a todos los compañeros del Hospital y el Instituto de Investigación Nationwide Children's de Columbus (Ohio, EE.UU.) que trabajaron en algún momento conmigo y/o participaron en este estudio. Disfruté mucho trabajando con ellos y aprendí que el éxito de un proyecto de investigación se fundamenta en el buen trabajo en equipo.

A mis compañeros Teresa Hernández-Sampelayo, Marisa Navarro, Jesús Saavedra y Mar Santos de la sección de Enfermedades Infecciosas de Pediatría del Hospital Gregorio Marañón, por hacerme sentir en el despacho de la 5ª planta como en mi casa, por su amistad y por creer en mí, por sus enseñanzas y críticas para hacerme mejor infectóloga.

Gracias a mi tío, el Dr. Miguel Ángel Suárez, por haberme acompañado en mi trayectoria profesional y confiar en mí siempre. Él es mi modelo a seguir por su humanidad, su excelencia en el trabajo, su entrega amorosa a sus pacientes, porque sabe cómo curar la enfermedad del cuerpo con sus manos y la del alma con sus palabras.

A mis amigos, por sus palabras, mensajes y llamadas de ánimo, por sus abrazos, por decirme que me echaban de menos, porque quedar con ellos durante estos años ha sido el carburante que movía el motor de mi ilusión para finalizar este proyecto.

A mis padres, por su apoyo incondicional, su confianza y su amor en estos 34 años: no hay palabras que puedan demostrar mi eterno agradecimiento a ellos. Por

enseñarme el valor del trabajo, de la honestidad, la honradez y el sacrificio como vías fundamentales y legítimas para alcanzar nuestras metas en la vida. A mis hermanos, Inmaculada y José Ramón, porque jugando juntos aprendimos a vivir. Por su amistad a lo largo de los años, por decirme que están orgullosos de mí y por darme, en la distancia, su apoyo y su calor.

Muchas gracias a mi esposo Juanma, por su amor, su comprensión infinita, por apoyar todos mis proyectos y por impulsar todos mis sueños, por sus abrazos curativos y sus palabras siempre amables. Gracias por entender el sacrificio que ha supuesto para nosotros concluir este proyecto; añoro cada minuto que no he podido sujetar su mano por ello. Caminar a su lado en la vida es lo más hermoso que me ha ocurrido nunca. Este triunfo no es sólo mío, es NUESTRO. Disfrutémoslo.

Y, por último, gracias a los padres de todos los pequeños pacientes que he conocido a lo largo de estos 9 años de profesión, por confiarme lo más precioso de sus vidas: los hijos. Gracias a los niños y sus familias por permitirme entrar en un rincón de su intimidad, por enseñarme cómo enfrentarse al dolor, a aceptar la enfermedad y a valorar la salud y la vida. Me siento honrada por ser médico y afortunada por tener la oportunidad de trabajar en lo que amo y siento como un proyecto vital.

A todos, GRACIAS.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## I. ÍNDICE GENERAL

<b>CAPÍTULO 1. ESTADO DEL ARTE.....</b>	<b>1</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1. PERSPECTIVA HISTÓRICA.....	3
1.2. BRONQUIOLITIS AGUDA.....	5
1.2.1. Definición.....	5
1.3. EL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL.....	6
1.3.1. Clasificación taxonómica y características.....	6
1.3.2. Epidemiología de la infección aguda por VRS.....	9
1.3.3. Patogenia de la enfermedad.....	10
1.3.3.1. Factores virales.....	11
1.3.3.2. La respuesta inmunológica.....	12
1.3.3.2.1. Inmunidad innata y citoquinas.....	12
1.3.3.2.2. Inmunidad adaptativa.....	13
1.3.3.2.2.1. Inmunidad celular.....	13
1.3.3.2.2.2. Inmunidad humoral.....	14
1.3.4. Factores de riesgo de la infección grave por VRS.....	15
1.3.4.1. Determinantes genéticos.....	15
1.3.4.2. Edad y sexo.....	15
1.3.4.3. Patología de base.....	16
1.3.4.4. Otros factores.....	16
1.4. LA COLONIZACIÓN BACTERIANA NASOFARÍNGEA: COLONIZACIÓN VS.	
INFECCIÓN.....	18
1.4.1. Poblaciones bacterianas colonizadoras del tracto respiratorio	
superior.....	18
1.4.2. Factores que afectan a la colonización nasofaríngea.....	19
1.4.2.1. Interacciones virus-bacteria.....	19
1.4.2.2. El VRS y la colonización bacteriana nasofaríngea.....	23
1.4.2.2.1. Estudios experimentales.....	24
1.4.2.2.2. Estudios epidemiológicos.....	26
1.4.3. Colonización bacteriana nasofaríngea en el niño con bronquiolitis	
aguda y sibilancias producidas por virus.....	28
1.5. COMENTARIOS FINALES A LA INTRODUCCIÓN.....	30

<b>CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....</b>	<b>31</b>
2.1. JUSTIFICACIÓN.....	33
<b>CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
3.1. HIPÓTESIS.....	37
3.2. OBJETIVOS.....	38
3.2.1. Objetivos principales.....	38
3.2.2. Objetivos secundarios.....	38
<b>CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
4.1. DISEÑO Y CANDIDATOS DEL ESTUDIO.....	43
4.1.1. Descripción y localización del estudio.....	43
4.1.2. Definiciones.....	44
4.1.3. Pacientes.....	45
4.1.3.1. Criterios de inclusión.....	45
4.1.3.2. Criterios de exclusión.....	45
4.1.4. Controles sanos.....	45
4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PARTICIPANTES Y RECLUTAMIENTO.....	46
4.2.1. Proceso de identificación, selección y reclutamiento.....	46
4.2.2. Aprobación del Comité de Ética.....	48
4.3. RECOGIDA DE DATOS.....	49
4.3.1. Variables del estudio.....	49
4.3.1.1. Características demográficas y epidemiológicas.....	49
4.3.1.2. Determinantes de gravedad de la enfermedad.....	49
4.3.1.3. Parámetros de laboratorio y microbiológicos.....	50
4.3.1.4. Hallazgos radiológicos.....	50
4.4. RECOGIDA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS: METODOLOGÍA DE LABORATORIO.....	51
4.4.1. Muestras respiratorias.....	51
4.4.1.1. Frotis nasofaríngeo.....	51
4.4.1.1.1. Procedimiento.....	52
4.4.1.1.2. Medios de cultivo y medición de la densidad bacteriana.....	54
4.4.1.2. Lavado nasal.....	55
4.4.1.2.1. Procedimiento.....	55
4.4.1.2.2. Conteo y descripción de leucocitos.....	58

4.4.1.2.2.1. Utilización del hemocitómetro.....	58
4.4.1.2.2.2. Contabilización y tinción.....	60
4.4.1.2.3. Identificación y cuantificación del VRS por PCR en tiempo real.....	60
4.4.2. Muestras de sangre: análisis de citoquinas en plasma.....	61
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62
<b>CAPÍTULO 5. RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
5.1. SUJETOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO.....	65
5.1.1. Sujetos reclutados y excluidos.....	65
5.2. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA.....	67
5.2.1. Niños con bronquiolitis por VRS y controles sanos.....	67
5.2.1.1. Características demográficas.....	67
5.2.1.2. Parámetros de laboratorio.....	68
5.3. TRATAMIENTO CON ANTIBIÓTICOS Y COLONIZACIÓN NASOFARÍNGEA.....	69
5.3.1. Tasas de colonización nasofaríngea y especies bacterianas.....	69
5.3.2. Efecto general de los antibióticos sobre la colonización nasofaríngea.....	70
5.3.3. Efecto de los antibióticos sobre la densidad bacteriana.....	72
5.3.4. Características demográficas, clínicas y de laboratorio de los niños tratados o no con antibióticos.....	73
5.4. COLONIZACIÓN NASOFARÍNGEA Y EVOLUCIÓN CLÍNICA EN NIÑOS CON BRONQUIOLITIS POR VRS NO TRATADOS CON ANTIBIÓTICOS.....	75
5.4.1. Características microbiológicas en niños con bronquiolitis por VRS y controles sanos.....	76
5.4.2. Características de la bronquiolitis por VRS y evolución clínica de la enfermedad en los niños colonizados por bacterias potencialmente patógenas.....	80
5.4.2.1. Características demográficas.....	81
5.4.2.2. Características clínicas y parámetros de gravedad de la enfermedad.....	82
5.4.2.3. Parámetros de laboratorio en sangre y lavado nasal.....	84
5.4.2.4. Hallazgos radiológicos.....	88

5.5. CITOQUINAS PLASMÁTICAS EN NIÑOS CON BRONQUIOLITIS POR VRS	
COLONIZADOS POR BACTERIAS POTENCIALMENTE PATÓGENAS.....	90
5.5.1. Características demográficas, clínicas y de laboratorio de los niños en los que se realizó análisis de citoquinas.....	91
5.5.2. Concentración de citoquinas plasmáticas en relación al tipo de bacteria potencialmente patógena aislada en la nasofaringe.....	93
5.5.3. Relación citoquinas-densidad bacteriana nasofaríngea.....	94
5.5.4. Relación citoquinas-gravedad de la bronquiólitis por VRS.....	95
<b>CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>97</b>
6.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS DE LA COHORTE.....	100
6.2. INFECCIONES BACTERIANAS EN EL CONTEXTO DE LA BRONQUIOLITIS POR VRS.....	101
6.3. EL TRATAMIENTO CON ANTIBIÓTICOS ES FRECUENTE Y MODIFICA SIGNIFICATIVAMENTE LOS PATRONES DE COLONIZACIÓN NASOFARÍNGEA EN NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS CON BRONQUIOLITIS POR VRS.....	105
6.4. COLONIZACIÓN BACTERIANA NASOFARÍNGEA EN LACTANTES INFECTADOS POR EL VRS Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS.....	108
6.4.1. Relación de la colonización bacteriana con la gravedad de la bronquiólitis.....	112
6.4.2. Respuesta local y sistémica a la colonización bacteriana.....	114
6.5. ¿CÓMO DIFERENCIAR COLONIZACIÓN DE INFECCIÓN? EL PAPEL DE LOS BIOMARCADORES.....	116
6.5.1. Densidad bacteriana.....	116
6.5.2. Biomarcadores convencionales.....	117
6.5.3. Nuevos biomarcadores.....	119
6.6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	121
<b>CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>125</b>
7.1. CONCLUSIONES.....	127
<b>CAPÍTULO 8. APLICACIONES PRÁCTICAS.....</b>	<b>129</b>
8.1. APLICACIONES PRÁCTICAS.....	131
<b>CAPÍTULO 9. ANEXOS.....</b>	<b>133</b>
ANEXO A. CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO.....	135
ANEXO B. AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA.....	141
ANEXO C. COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E	

INTERNACIONALES.....	142
ANEXO D. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	147
<b>CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>159</b>
10.1. BIBLIOGRAFÍA.....	161

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Microscopía electrónica de la liberación de un paramyxovirus de la superficie apical de células infectadas.....	7
Figura 2.- Estructura del VRS.....	8
Figura 3.- Variabilidad del microbioma nasofaríngeo.....	19
Figura 4A.-Mecanismos a través de los cuales los virus respiratorios favorecen la colonización bacteriana.....	21
Figura 4B.-Interacciones virus-bacteria en el epitelio respiratorio en relación con el sistema inmune del huésped.....	22
Figura 5.- Modelo propuesto de interacciones bacterianas y virales.....	23
Figura 6.- El VRS se adhiere directamente a <i>S. pneumoniae</i> mediante la glicoproteína G de superficie.....	24
Figura 7.- Concentraciones de citoquinas y quemocinas secretadas en el sobrenadante del cultivo celular tras 2 horas de exposición de <i>S. pneumoniae</i> a células epiteliales ciliadas humanas infectadas o no previamente con VRS.....	25
Figura 8.- Relación temporal entre el pico estacional (en semanas) de las hospitalizaciones debidas al VRS y las debidas a neumonía neumocócica en diferentes estados de EE.UU.....	27
Figura 9.- Relación entre la incidencia de infección por el VRS (en azul) y la neumonía neumocócica (en rojo) en niños de California, EE.UU.....	27
Figura 10.- Identificación, selección y reclutamiento de los participantes: “Porque 2 más 2 no son siempre 4...” .....	47
Figura 11.- Reclutamiento de los participantes. Gestión del tiempo.....	47
Figura 12.- Hisopo flexible de nailon utilizado para el estudio.....	51
Figura 13.- Realización del frotis nasofaríngeo.....	53
Figura 14.- Sistema de siembra por agotamiento en 4 cuadrantes.....	55
Figura 15.- Recipiente contenedor de secreciones respiratorias.....	56
Figura 16.- Esquema resumen del procesamiento de las muestras de lavado nasal...	57
Figura 17.- Hemocitómetro. Esquema del porta y cubreobjetos.....	58
Figura 18.- Esquema descriptivo de la retícula grabada de un hemocitómetro.....	59
Figura 19.- Carga del hemocitómetro con la dilución células-azul tripán.....	59
Figura 20.- Pacientes visitados: proporción de reclutamiento.....	65
Figura 21.- Pacientes reclutados y pacientes incluidos finalmente en el estudio.....	66

Figura 22.- Resultados de los frotis nasofaríngeos en el total de pacientes.....	70
Figura 23.- Resultado de los frotis nasofaríngeos según la administración o no de antibióticos antes de la recogida de las muestras.....	71
Figura 24.- Colonización nasofaríngea única o múltiple según la administración o no de antibióticos antes de la recogida de las muestras.....	72
Figura 25.- Tasas de colonización nasofaríngea en niños hospitalizados por bronquiolitis por VRS y controles sanos.....	76
Figura 26.- Tipo y porcentaje de bacterias colonizadoras de la nasofaringe en niños hospitalizados por bronquiolitis por VRS y controles sanos.....	77
Figura 27.- Proporción de bacterias potencialmente patógenas gram-negativas (BGN) y gram-positivas (BGP), en frotis con una sola bacteria identificada, en pacientes con bronquiolitis por VRS y controles sanos.....	78
Figura 28.- Tipos de bacterias identificadas en los frotis nasofaríngeos de los pacientes hospitalizados con bronquiolitis por VRS que no recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras.....	80
Figura 29.- Duración del tratamiento con oxígeno suplementario en niños con bronquiolitis por VRS colonizados por bacterias potencialmente patógenas gram-positivas (BGP) y colonizados por bacterias potencialmente patógenas gram-negativas (BGN).....	84
Figura 30.- Porcentaje de neutrófilos en el hemograma de niños con bronquiolitis por VRS que no recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras, según el tipo de colonización nasofaríngea.....	86
Figura 31.- Leucocitos totales en lavado nasal de niños con bronquiolitis por VRS colonizados por flora respiratoria o bacterias potenciamente patógenas (BPP).....	87
Figura 32.- Puntuación en el score clínico de gravedad de la enfermedad según el patrón radiológico de niños con bronquiolitis por VRS colonizados por bacterias potencialmente patógenas.....	89
Figura 33.- Concentraciones de citoquinas en plasma de acuerdo con el tipo de la colonización bacteriana de la nasofaringe.....	93
Figura 34.- Concentraciones de IL-6 y IL-8 de acuerdo con la densidad nasofaríngea de bacterias potencialmente patógenas.....	95
Figura 35.- Infecciones bacterianas graves en niños menores de 2 años ingresados por bronquiolitis (VRS vs. no-VRS).....	101

Figura 36.- Cultivos de tubo endotraqueal y duración de la hospitalización en niños con bronquiolitis ingresados en la UCIP de Nationwide Children's Hospital (2009–10).....	104
Figura 37.- Comparación de las tasas de colonización por tipo de bacteria potencialmente patógena (BPP) en niños con infección del tracto respiratorio inferior por VRS.....	112
Figura 38.- Perfiles de expresión genómica del huésped: un nuevo enfoque para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.....	120



### III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Valoración clínica de la gravedad de la enfermedad por VRS (Clinical Disease Severity Score; CDSS). .....	50
Tabla 2.- Características demográficas en niños con infección por VRS y controles sanos.....	67
Tabla 3.- Parámetros de laboratorio en sangre periférica y muestras respiratorias en niños con infección por VRS y controles sanos.....	69
Tabla 4.- Características demográficas y parámetros de laboratorio en niños con bronquiolitis VRS tratados con y sin antibióticos antes de la recogida de las muestras.....	73
Tabla 5.- Determinantes de gravedad de la enfermedad y características radiológicas en niños con bronquiolitis VRS tratados con y sin antibióticos antes de la recogida de las muestras.....	74
Tabla 6.- Características demográficas de los niños con bronquiolitis por VRS que no habían recibido antibióticos previos y de los controles sanos.....	75
Tabla 7.- Combinaciones de bacterias potencialmente patógenas (BPP) en frotis nasofaríngeos polibacterianos de niños ingresados por bronquiolitis por VRS y controles sanos.....	79
Tabla 8.- Características demográficas de los niños con bronquiolitis por VRS que no recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras, según estuvieran colonizados o no por bacterias potencialmente patógenas.....	81
Tabla 9.- Características clínicas y parámetros de gravedad de los niños con bronquiolitis por VRS que no recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras, según estuvieran colonizados o no por bacterias potencialmente patógenas.....	83
Tabla 10.- Realización de hemograma y recuento diferencial en los niños con bronquiolitis por VRS que no recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras, según estuvieran colonizados o no por bacterias potencialmente patógenas.....	85
Tabla 11.- Parámetros de laboratorio en muestras de lavado nasal en pacientes que no recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras, según la colonización bacteriana.....	87
Tabla 12.- Características radiológicas en los niños con bronquiolitis por VRS que no	

recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras, según estuvieran colonizados o no por bacterias potencialmente patógenas.....	88
Tabla 13.- Características clínicas y determinantes de gravedad según el patrón radiológico de los niños con bronquiolitis por VRS colonizados por bacterias potencialmente patógenas.....	90
Tabla 14.- Características demográficas, clínicas, radiológicas y de laboratorio de los pacientes con bronquiolitis por VRS y controles sanos en los que se realizó análisis de citoquinas.....	92
Tabla 15.- Estudios sobre el VRS y la neumonía bacteriana en niños con infección respiratoria grave.....	103
Tabla 16.- Utilidad de los niveles de procalcitonina en la interpretación de los datos de microbiología clínica en pacientes con infecciones del tracto respiratorio inferior.....	118

#### IV. ABREVIATURAS

AAP	Academia Americana de Pediatría
ARN	Ácido ribonucleico
BGN	Bacterias gram-negativas
BGP	Bacterias gram-positivas
BPP	Bacterias potencialmente patógenas
CD8+	Células T CD8 positivo
CDSS	Puntuación clínica de la gravedad de la enfermedad por VRS
CO2	Dióxido de carbono
EIA	Enzimoimmunoanálisis
Fig./Figs.	Figura/figuras
FN	Frotis nasofaríngeo
FR	Flora respiratoria comensal
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
ITRI	Infección del tracto respiratorio inferior
ITRS	Infección del tracto respiratorio superior
IVRB	Infección de las vías respiratorias bajas
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
μl	Microlitro
NCH	Hospital Nationwide Children's
NK	Células natural killer
nm	Nanómetro
O2	Oxígeno
OMA	Otitis media aguda
OR	Odds ratio
PCT	Procalcitonina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa
RANTES	Células T normales expresadas y secretadas por activación

RPM	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Th1	Linfocitos T colaboradores 1
Th2	Linfocitos T colaboradores 2
Th17	Linfocitos T colaboradores 17
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
T reg	Células T reguladoras
UCIP	Unidad de cuidados intensivos pediátricos
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VRS	Virus respiratorio sincitial

# **CAPÍTULO 1. ESTADO DEL ARTE**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. PERSPECTIVA HISTÓRICA

En 1957, Chanock y sus colaboradores<sup>1</sup> identificaron por primera vez el virus respiratorio sincitial (VRS), inicialmente aislado en secreciones respiratorias en una colonia de chimpancés, en un niño con bronquiolitis y en otro con neumonía,<sup>2,3</sup> sin sospechar que este virus sería el virus respiratorio más importante y de mayor repercusión en los dos primeros años de la vida en países desarrollados y en vías de desarrollo.<sup>4</sup> A día de hoy, y a pesar de los esfuerzos de la comunidad científica, no existe un tratamiento específico o vacuna efectiva o segura contra el VRS, por lo que el manejo se centra en el tratamiento de soporte y en la prevención de la infección mediante medidas higiénicas, fundamentalmente el lavado de manos, y anticuerpos monoclonales, indicados únicamente en niños de alto riesgo. Numerosos estudios epidemiológicos han identificado grupos de riesgo de desarrollar enfermedad grave (como la prematuridad, la enfermedad pulmonar crónica y las cardiopatías congénitas), así como otros factores sociales, demográficos y ambientales tales como la exposición al humo del tabaco, la presencia de hermanos en el ámbito familiar, la asistencia a guardería, los bajos ingresos económicos o el no haber recibido lactancia materna.<sup>3,5,6</sup> Sin embargo, la mayoría de los niños que desarrollan una infección grave por VRS son previamente sanos y no presentan ningún factor de riesgo,<sup>7-10</sup> lo que nos lleva a cuestionarnos la existencia de otros agentes poco estudiados o aún desconocidos que puedan explicar la peor evolución de estos pacientes. Las bacterias que colonizan el tracto respiratorio de estos niños podría ser uno de estos factores.

En los últimos años, el estudio del microbioma nasofaríngeo ha ido cobrando protagonismo y éste se propone actualmente como un factor que puede influir en la evolución de diferentes enfermedades respiratorias. De todos los microorganismos que constituyen dicho microbioma, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* se han identificado como las bacterias patógenas más importantes y más frecuentemente implicadas en las infecciones del tracto respiratorio.<sup>11-13</sup> En estudios recientes, la presencia de al menos uno de estos patógenos en el contexto de una infección vírica del tracto respiratorio se ha asociado

a mayor probabilidad de complicaciones agudas, como otitis media aguda<sup>14,15</sup> o neumonía,<sup>16,17</sup> peor evolución clínica<sup>18,19</sup> y a una mayor frecuencia de complicaciones futuras, como el desarrollo de mayor número de sibilancias recurrentes o asma,<sup>19-21</sup> siendo la evidencia mucho más limitada si nos referimos concretamente a la infección por VRS.<sup>22,23</sup>

A pesar de todos estos avances, sólo estamos al comienzo de un largo camino. Por una parte, no se conoce completamente cuál es el microbioma nasofaríngeo basal en los individuos sanos, ya que se ha comprobado que la composición y diversidad del mismo varía a lo largo del tiempo, intra e interindividualmente.<sup>24-26</sup> Además, todavía no se conocen bien los mecanismos inmunológicos involucrados en el reconocimiento del microbioma simbiótico o patológico y en la activación de las respuestas inmunitarias para mantener el equilibrio en el nicho ecológico.<sup>27,28</sup> Además, en el contexto de la infección respiratoria por el VRS, se desconoce la relación que existe entre el virus durante la fase aguda de la enfermedad y las bacterias colonizadoras de la nasofaringe, y si dicha asociación contribuye al desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones.

A partir de aquí, el trabajo que se presenta pretende ser un paso en entender si factores como la colonización bacteriana del tracto respiratorio superior, que hasta entonces no se había considerado, representa un factor de riesgo de enfermedad más grave en lactantes con infección por VRS. Nuestra historia se comporta como una novela coral que tiene tres actores principales: el VRS, la población pediátrica diana infectada por el virus (niños menores de 2 años de edad), y las bacterias presentes en la nasofaringe de estos niños. La bronquiolitis aguda, como consecuencia más importante de la infección por el VRS, es el escenario en el que estos tres protagonistas se encuentran e interactúan, cuyos papeles son una incógnita aún pendiente de resolver.



## 1.2. BRONQUIOLITIS AGUDA

### 1.2.1. Definición

La bronquiolitis aguda se define como un conjunto de síntomas y signos clínicos causado por una infección vírica que se produce en lactantes menores de 24 meses, en los cuales, tras un corto periodo prodrómico de síntomas de vías respiratorias altas (rinitis, tos), se produce infección del tracto respiratorio inferior (ITRI) con inflamación de la vía aérea distal asociado a la producción de tos, taquipnea de comienzo agudo, sibilancias o crepitantes finos con o sin fiebre.<sup>2,29</sup>

A pesar de que el término bronquiolitis se acuña desde 1940, hay pequeñas variaciones en los criterios diagnósticos entre los distintos centros sanitarios o entre los diferentes países.<sup>2</sup> En 1983, McConnochie<sup>30</sup> la definió como el “primer episodio agudo de sibilancias en un niño menor de 24 meses, que se presenta con dificultad respiratoria y existencia de pródromos catarrales”, y basó su definición en cinco parámetros clínicos que han resultado de gran utilidad en la práctica clínica:

- a) disnea espiratoria de comienzo agudo;
- b) edad inferior o igual a 24 meses;
- c) signos de enfermedad respiratoria vírica como coriza, otitis o fiebre;
- d) con o sin indicios de distrés respiratorio;
- e) debe ser el primer episodio

En España en 2010, el grupo de trabajo de la “Guía de Práctica Clínica sobre Bronquiolitis Aguda” del Ministerio de Sanidad<sup>31</sup> estableció por consenso una definición operativa de bronquiolitis aguda: “primer episodio de inflamación de las vías respiratorias bajas (bronquios y bronquiolos), presumiblemente inducida por virus, en menores de 24 meses”. Son estas definiciones las que hemos utilizado para nuestro estudio.

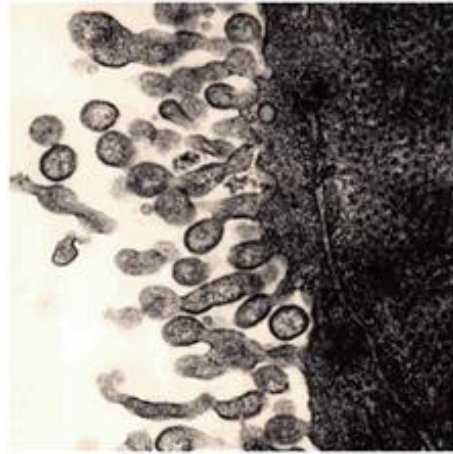
La bronquiolitis aguda constituye la primera causa de hospitalización infantil en todo el mundo, asociada a una importante morbilidad tanto en países desarrollados

como en vías de desarrollo.<sup>7,32,33</sup> Sólo en los EE.UU. los gastos asociados a esta enfermedad superan los 1.730 millones de dólares cada año.<sup>34</sup> El VRS es el agente causal más frecuente de bronquiolitis en los lactantes y niños menores de 2 años, siendo responsable del 50-80% de los casos, especialmente en las formas graves,<sup>8,35-40</sup> por lo tanto, la bronquiolitis producida por VRS representa la primera causa mundial de hospitalización en este mismo grupo de edad.<sup>41</sup> El segundo agente etiológico implicado en la bronquiolitis es el rinovirus,<sup>42,43</sup> seguido por el virus parainfluenza, metapneumovirus humano, virus influenza, adenovirus, coronavirus y bocavirus humano.<sup>2</sup> Por razones que aún no son bien conocidas, se ha observado un aumento en el número de casos de bronquiolitis en las últimas décadas, sobre todo las causadas por el VRS,<sup>7,8,44</sup> tanto del número de formas graves que requieren hospitalización como del número de casos atendidos en los centros de salud de Atención Primaria, donde la enfermedad supone incluso una mayor carga asistencial.<sup>9,31</sup> A pesar de ser una enfermedad muy frecuente en la infancia, se desconoce aún el papel exacto que el huésped, el virus, otros factores (como la colonización bacteriana) o la combinación de todos ellos juegan en la gravedad de la enfermedad.

### 1.3. EL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL

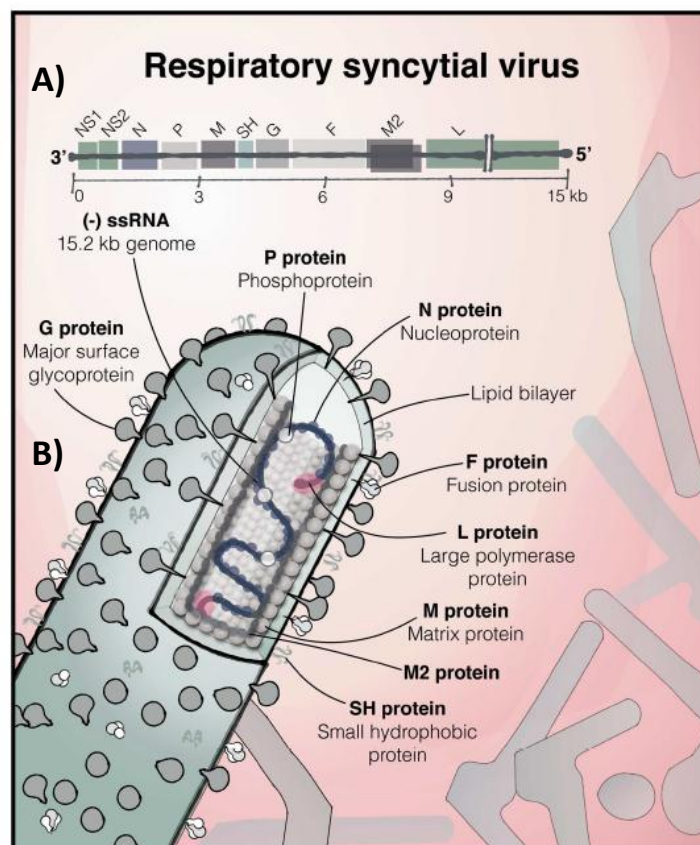
#### 1.3.1. Clasificación taxonómica y características

El VRS se clasifica dentro del género *Pneumovirus*, subfamilia *Pneumoviridae*, familia *Paramixoviridae*, del orden de los *Mononegavirales*.<sup>4,45</sup> Está compuesto por una única cadena de ARN no segmentada dispuesta en sentido negativo, que asociada a proteínas virales (nucleoproteína “N”, fosfoproteína “P” y nucleoproteína grande “L”) constituye una nucleocápside helicoidal que se encuentra envuelta por una cubierta bilipídica. Los viriones son pleomórficos, y aunque generalmente adquieren una forma esférica irregular de diámetro entre 150-300 nm, también se observan formas filamentosas (**Fig. 1**).<sup>46</sup>



**Figura 1.** Microscopía electrónica de la liberación de un paramyxovirus de la superficie apical de células infectadas. Se observan viriones con formas esféricas y filamentosas brotando de la superficie celular. Tomado de Roberts et al.<sup>47</sup>

El genoma viral consta de 10 genes en el orden 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5', los cuales codifican 11 proteínas,<sup>4,46,48</sup> 9 de ellas estructurales y 2 no estructurales. De las proteínas estructurales, las más importantes son dos glucoproteínas de superficie: la proteína "G", que permite la adhesión del virus a las células del epitelio respiratorio, y la proteína de fusión "F", fundamental para la fusión del virus en la célula. La membrana bilipídica contiene estas dos glucoproteínas de transmembrana, además de la pequeña proteína hidrofóbica SH, organizadas en espículas. Otras proteínas asociadas a la envoltura lipídica son la proteína de la matriz "M" y la proteína M2 (ésta última compuesta a su vez por 2 polipéptidos M2-1, M2-2).<sup>49</sup> Las proteínas NS1 y NS2 no son proteínas estructurales y por tanto sólo se encuentran en las células infectadas y no en los viriones (**Fig. 2**).<sup>2</sup>



**Figura 2. Estructura del VRS.** A) Genoma del VRS: única cadena de ARN de 15,2 kb en sentido negativo que consta de 10 genes, los cuales codifican 11 proteínas. B) Ilustración de una partícula de VRS filamentosas. La membrana exterior contiene la glicoproteína de superficie G, fuertemente glicosilada, y las proteínas F (de fusión) y SH. La matriz proteica se encuentra dentro de la membrana, rodeando el complejo de ribonucleoproteínas, que consiste en el genoma asociado con las proteínas N, P, y la gran ARN polimerasa dependiente de ARN (L). Modificado de Lambert et al.<sup>48</sup>

Las proteínas F y G constituyen los determinantes antigénicos más importantes del virus, e inducen la producción de anticuerpos neutralizantes. El VRS presenta escasa heterogeneidad antigénica, estableciéndose dos grupos antigénicos principales, el A, con 11 genotipos en base principalmente a la proteína G (GA1-GA7, SAA1, NA1-NA2 y ON1) y el B, con 23 genotipos (GB1-GB4, SAB1-SAB3, SAB4, URU1, URU2, BA1-BA12 y THB).<sup>2,50-52</sup> Epidemiológicamente, son más frecuentes las infecciones producidas por genotipos del subtipo A, aunque esto puede variar según la temporada, el país, etc.<sup>50,53-57</sup>

### 1.3.2. Epidemiología de la infección aguda por VRS

Se estima que, globalmente, a la edad de 2 años, más del 90% de los niños han sido infectados al menos una vez por el VRS y aproximadamente el 0,5-2% de ellos han precisado hospitalización.<sup>7,58-60</sup> La mayor proporción de hospitalizaciones debidas al VRS ocurre en el primer año de edad (tasa estimada de 1,2 a 3,1% de la población menor de 1 año).<sup>44,61-63</sup> De hecho, la edad constituye uno de los factores de riesgo principales de desarrollar enfermedad grave.<sup>48,64,65</sup>

Sólo en EE.UU., la enfermedad por VRS causa de 132.000 a 172.000 ingresos hospitalarios al año en niños menores de 5 años, 60-80% de los cuales ocurren en lactantes menores de 12 meses.<sup>3,66</sup> En Europa, el VRS supone aproximadamente el 45% de los ingresos hospitalarios por ITRI en niños menores de 2 años de edad, y se observa una tendencia en los últimos años a que estos pacientes ingresados sean de menor edad y cursen con una evolución clínica más grave.<sup>5,63</sup> En nuestro país la mayoría de los datos sobre la incidencia de hospitalización debido al VRS proceden generalmente de centros hospitalarios aislados o de una única comunidad autónoma.<sup>67-69</sup> Un estudio realizado entre julio de 1996 y junio del año 2000 en Guipúzcoa, determinó una tasa de ingreso de 3,7% en los lactantes menores de 6 meses y de 2,5% de los lactantes menores de 12 meses.<sup>69</sup> Con el fin de determinar la carga asistencial que supone el VRS en España, se publicó recientemente un estudio en el que se determinaron las tasas de hospitalización por VRS en niños menores de 5 años desde 1997 a 2011 a través del Sistema Nacional de Vigilancia. En este estudio, que incluyó más del 98% de los hospitales españoles, se estableció que 286.007 niños menores de 2 años fueron hospitalizados por infección por VRS durante estos 15 años, con una incidencia anual de 2.413 pacientes por cada 100.000 niños. Además, se documentó que las tasas de hospitalización y mortalidad más elevadas ocurrían en el primer año de vida (el 80% de todas las muertes se produjeron en los menores de 12 meses de edad).<sup>70</sup>

Un metanálisis reciente demostró que el VRS ocasiona anualmente 33,8 millones de episodios nuevos de ITRI en niños menores de 5 años (lo que representa el 22% de todos los episodios de ITRI), de los cuales al menos un 10% necesitan hospitalización y entre 66.000 y 199.000 fallecen cada año por esta enfermedad en

países subdesarrollados o en vías de desarrollo.<sup>71</sup> Otro metanálisis publicado posteriormente analizó la mortalidad específica atribuida al VRS, para lo cual se revisaron las 235 principales causas de mortalidad en 187 países de todo el mundo durante 30 años (desde 1980 a 2010). En este estudio se estableció que el VRS es responsable de 234.000 muertes cada año en niños menores de 5 años, de las cuales el 86% se producen en el grupo de lactantes entre los primeros 28 días de vida y el primer año de edad, donde el VRS representaría el 6,7% de todas las causas de mortalidad en este grupo etario, siendo por tanto el segundo agente infeccioso que se asocia a mayor mortalidad infantil a nivel mundial, sólo por detrás de la malaria. En este estudio, de nuevo, la mayor parte de las muertes debidas a VRS se documentaron en los países en vías de desarrollo.<sup>72</sup> En Latinoamérica, la tasa de mortalidad atribuible a la infección por VRS en niños menores de 2 años es del 1,7%.<sup>59</sup> En general, la mortalidad asociada a la primoinfección por VRS en países desarrollados en niños previamente sanos es menor del 1%<sup>2</sup> aunque puede aumentar hasta un 6% en la población de riesgo.<sup>59,73</sup>

Las epidemias de VRS ocurren cada año en países de clima templado durante los meses de invierno de forma predecible, sin embargo el VRS puede aislarse durante todo el año en zonas de clima húmedo y muy cálido.<sup>74-77</sup> En países de clima templado del hemisferio norte la estación del VRS generalmente comienza entre octubre-noviembre y finaliza en abril-mayo.<sup>76,78</sup> No obstante, y aunque en general las epidemias duran de 12 a 20 semanas, hay pequeñas variaciones anuales en el comienzo y duración de estas epidemias.<sup>75,79-81</sup>

### **1.3.3. Patogenia de la enfermedad**

En la patogenia de la infección por VRS, tanto el virus como la respuesta inmune del huésped juegan un papel fundamental, y es el balance entre estos y otros componentes aún por entender los que determinarán la gravedad de las manifestaciones clínicas. El VRS presenta una alta especificidad por la mucosa respiratoria, y la replicación fuera del aparato respiratorio es excepcional<sup>82</sup> salvo en ciertas inmunodeficiencias de células T o B.<sup>66</sup> La infección viral en la población infantil

produce mayoritariamente afectación del tracto respiratorio superior, aunque hasta un tercio de pacientes desarrollarán infección de las vías respiratorias bajas (IVRB), en forma de bronquiolitis aguda (principalmente) o neumonía.<sup>48,83</sup> A nivel anatomopatológico se produce edema, aumento de moco, alteración de los cilios, necrosis celular con descamación de las células epiteliales e infiltración linfocítica peribronquiolar, lo que finalmente conlleva la obstrucción de la vía aérea pequeña y atelectasias pulmonares.<sup>66</sup> El periodo de incubación de la bronquiolitis por VRS es de 5 días (2-7 días) y se sabe que el virus se sigue eliminando durante 2-3 semanas tras la infección aguda.<sup>84-87</sup>

### 1.3.3.1. Factores virales

Los datos existentes en relación a la carga viral y la gravedad clínica de la enfermedad son contradictorios. Mientras que algunos estudios han identificado una asociación directa entre la mayor cantidad de virus en secreciones respiratorias y la peor evolución clínica,<sup>40,88-95</sup> otros no han encontrado una clara asociación.<sup>96-101</sup> Esto puede ser debido a diferencias en el diseño del estudio, ya que en la mayoría de ellos sólo se obtuvo una muestra de secreciones respiratorias en el momento de inclusión en el estudio sin tener en cuenta la evolución de la enfermedad, a la técnica empleada (cultivo viral, RT-PCR) o a la inclusión de poblaciones heterogéneas de pacientes.<sup>40,94,102</sup>

En relación con los subtipos y genotipos del VRS se sabe que los subtipos antigénicos A y B suelen co-circular durante las epidemias anuales.<sup>50,103,104</sup> En general, el subtipo A se ha asociado a una mayor gravedad de la enfermedad.<sup>55,56,103,105-112</sup> La infección natural ocasionada por ambos grupos antigénicos en lactantes se asocia a cargas virales similares, por lo que no parece que la gravedad atribuída al subtipo A sea debido a una mayor carga viral, sino posiblemente a otros factores virales o a diferencias en la capacidad de cada subtipo para inducir en el huésped una respuesta patogénica diferente.<sup>102,113,114</sup> En este sentido, algunos estudios sugieren que determinados genotipos podrían asociarse a mayor gravedad clínica.<sup>55,114-116</sup> En un estudio reciente realizado en Milán durante 5 temporadas epidémicas de VRS, se observó que los niños menores de 2 años infectados por el genotipo A/NA1

presentaban significativamente más ITRI y eran ingresados con más frecuencia que aquellos infectados por el genotipo A/ON1,<sup>50</sup> recientemente identificado.<sup>117,118</sup>

Por tanto, aunque el papel del virus es fundamental para el inicio de la infección, aún se desconocen los mecanismos que contribuyen a la gravedad de la enfermedad.

### **1.3.3.2. La respuesta inmunológica**

La respuesta inmunológica a la infección primaria por el VRS es pobre e incompleta, lo que explica que las reinfecciones sean frecuentes a lo largo de la vida.<sup>48</sup> El VRS activa parcialmente tanto a las células de la inmunidad innata (neutrófilos, monocitos, células NK, etc.) como adaptativa (linfocitos T y B) tanto a nivel sistémico como a nivel de la mucosa respiratoria.<sup>5,48,119</sup> La infección desencadena una respuesta inmunitaria en la que se liberan numerosos mediadores inflamatorios como citoquinas Th1 y Th2, quemocinas, leucotrienos, mediadores de activación de las vías neuronales y óxido nítrico, entre otros,<sup>2,83</sup> a la vez que induce la producción de moléculas de adhesión celular y migración (CD11B, ICAM-1, E-selectina...), necesarias para el reclutamiento de diferentes poblaciones celulares al lugar de la infección.<sup>2,45,120</sup>

**1.3.3.2.1. Inmunidad innata y citoquinas:** La inmunidad innata juega un papel fundamental en la patogénesis de la infección por VRS. Durante la infección, el VRS actúa directa e indirectamente sobre distintas poblaciones celulares, como los macrófagos, los monocitos o las células dendríticas, afectando su capacidad de presentar antígenos.<sup>121,122</sup> Además, gracias en parte a dos de las proteínas no estructurales (NS1 y NS2), el VRS tiene también la habilidad de bloquear parcialmente las respuestas del interferón tipo I y II.<sup>4,48,120,123</sup>

Faden y sus colaboradores<sup>124</sup> propusieron que los neutrófilos emigran desde la sangre periférica a la mucosa respiratoria, donde se adhieren a las células infectadas por el virus liberando mediadores inflamatorios, como la interleuquina (IL) 8, que contribuyen al desarrollo de la enfermedad. El papel de los neutrófilos en la patogénesis de la bronquiolitis por VRS ha sido confirmado en estudios más recientes.<sup>125-127</sup> Se sabe también que las células dendríticas mieloides y plasmacitoides



son reclutadas a la mucosa del tracto respiratorio superior, el lugar de inicio de la infección.<sup>128-130</sup> En niños con infección por el VRS se ha descrito tanto un aumento en la concentración de citoquinas tipo Th1,<sup>131</sup> con un efecto generalmente proinflamatorio (IFN-gamma, IL-6, IL-8, CCL5/RANTES, IL-12), como de citoquinas Th2, más relacionadas con respuestas alérgicas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) y antiinflamatorias (IL-10), tanto en plasma<sup>100,131,132</sup> como en secreciones respiratorias.<sup>84,101,133-135</sup> En algunos casos, los altos niveles de algunas citoquinas, como IL-6 e IL-8, se han propuesto como marcadores de gravedad.<sup>132,134,136</sup> No obstante, estudios funcionales han demostrado que sólo los lactantes con formas más graves de la enfermedad ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP) presentan una producción disminuida de IL-8 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) tras estimular a las células de la inmunidad innata con lipopolisacárido (LPS).<sup>100</sup> Esta “inmunoparálisis” relativa se evidenció únicamente al realizar los estudios funcionales, ya que las concentraciones séricas basales de estas citoquinas estaban aumentadas de forma parecida en los lactantes con IVRB por VRS, independientemente de la gravedad. Por tanto, parece que una respuesta débil de la inmunidad innata (en vez de exagerada) se asociaría a formas más graves de la enfermedad.

### 1.3.3.2.2. Inmunidad adaptativa

*1.3.3.2.2.1. Inmunidad celular:* Las células CD4<sup>+</sup> reguladoras (T regs) son esenciales en las respuestas tempranas a la infección vírica local y favorecen el reclutamiento de otras células de la inmunidad (NK, Th17) en el tejido infectado, a la vez de modular la respuesta inmune para minimizar la lesión tisular y limitar la inflamación.<sup>137-139</sup> Aunque la mayoría de los estudios que han perfilado el papel de las células T regs se han realizado en modelos animales, parecen indicar que estas células juegan un papel importante en la infección natural por VRS en humanos.<sup>137,139,140</sup> Recientemente también se han implicado en la patogénesis de la enfermedad a las células T colaboradoras Th17.<sup>137,141</sup> Estas células favorecen la producción de IL-6, IL-23 e IL-17, esta última con gran capacidad proinflamatoria para reclutar neutrófilos.<sup>142</sup> Con respecto a la relevancia de la respuesta inmunitaria Th2 en la patogénesis de la infección, los resultados son contradictorios. Mientras que unos trabajos encuentran una polarización de la respuesta inmunitaria hacia Th2 y la relacionan con la gravedad

de la enfermedad respiratoria,<sup>5,143-145</sup> otros no comparten dicha afirmación.<sup>40,41,94,134,139,146</sup>

Inicialmente, algunos estudios sugirieron que las manifestaciones clínicas de la infección por VRS se debían en parte a una respuesta inmune “exagerada” (respuesta exacerbada de linfocitos T citotóxicos y citoquinas inflamatorias, polarización de respuestas Th2 sobre Th1, etc.).<sup>2,3,48,83,147</sup> Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que, en formas graves de la infección, existe una disminución de la producción de citoquinas inflamatorias tanto en el tracto respiratorio como a nivel sistémico, lo que sugiere que en estos casos no se genera una respuesta exagerada sino, por el contrario, ineficiente.<sup>100,101,148,149</sup> Mejías et al<sup>127</sup> confirmaron esta disregulación inmune inducida por el VRS a nivel transcripcional, en el que se observa la sobreexpresión de genes relacionados con los neutrófilos, la inflamación y el interferón, y la supresión de genes de células T y B. Otros autores han encontrado una asociación entre la enfermedad grave con la ausencia de linfocitos citotóxicos (CD8+) a nivel pulmonar.<sup>150,151</sup> Parece, por todo ello, que la expresividad clínica de la infección por el VRS depende en parte del balance entre estas respuestas inmunitarias pro- y antiinflamatorias, y que la respuesta proinflamatoria podría jugar un rol protector.<sup>101</sup>

*1.3.3.2.2.2. Inmunidad humoral:* La infección por el VRS conlleva, finalmente, la producción de anticuerpos específicos con cierta capacidad neutralizante, tanto en suero como a nivel de la mucosa.<sup>2,4</sup> Algunos estudios sugieren que la inmunoglobulina (Ig) A secretoria en la mucosa respiratoria limita parcialmente la propagación del virus, mostrando el papel de la respuesta local frente a la infección.<sup>5</sup> Por otra parte, la magnitud de la respuesta humoral es pobre en los primeros años de la vida, por lo que la protección generada es incompleta, justificando que las reinfecciones sean frecuentes a lo largo de la vida, incluso ocasionadas por la misma cepa del virus.<sup>48</sup> Parece que las reinfecciones producen una intensificación (“booster”) de la respuesta humoral, sobre todo a nivel de la secreción de IgA e IgG, lo que podría explicar que la primoinfección natural por el virus cause una enfermedad más grave que las reinfecciones posteriores.<sup>2,4</sup>

### 1.3.4. Factores de riesgo de la infección grave por VRS

A pesar de que la infección por VRS en pacientes con enfermedades de base o condiciones especiales conlleva una mayor morbi-mortalidad, el grupo de lactantes con factores de riesgo representa sólo la menor parte de los niños hospitalizados con bronquiolitis por VRS.<sup>69</sup> Un 10-20% de todos los pacientes que ingresan precisarán atención en la UCIP.<sup>58,100,152,153</sup> Tanto estudios prospectivos como retrospectivos poblacionales demuestran que más de un 70% de los niños ingresados por bronquiolitis por VRS en la planta de hospitalización y aproximadamente el 50% de los lactantes ingresados en la UCIP, son previamente sanos y no presentan ningún factor de riesgo conocido de enfermedad grave.<sup>7-10,63,154-156</sup> De ellos, hasta un 7% requerirá ventilación mecánica en algún momento durante el transcurso de su enfermedad.<sup>10,42,58,154,157</sup> En un estudio retrospectivo realizado en Noruega en el que se incluyeron 764 pacientes se observó que el 44% de los niños ingresados en la UCIP que precisaron ventilación mecánica no presentaba ningún factor de riesgo para enfermedad por VRS grave.<sup>10</sup> A pesar de que se han realizado numerosos estudios para identificar marcadores de riesgo que ayuden a predecir una evolución más grave, como la necesidad de ingreso hospitalario o de ingreso en UCIP, en el momento actual no disponemos de las herramientas necesarias que nos ayuden a clasificar a estos niños de forma precisa y su evolución es impredecible.

**1.3.4.1. Determinantes genéticos:** Numerosos estudios se han centrado en la identificación de polimorfismos genéticos asociados a formas graves de la enfermedad con resultados que no se han podido reproducir y han variado según la población a estudio.<sup>4,158</sup> Específicamente, se han asociado polimorfismos en el receptor toll-like tipo 4 (TLR-4), la IL-4, la IL-8, la IL-13 o el TNF- $\alpha$  con formas más graves de la enfermedad.<sup>158-162</sup> Aunque la predisposición genética podría explicar en parte la mayor susceptibilidad a padecer enfermedad grave por VRS en un subgrupo de pacientes, probablemente otros factores (ambientales, virales, desconocidos) contribuyen de forma importante.<sup>158</sup>

**1.3.4.2. Edad y sexo:** En general, el pico de máxima incidencia de la bronquiolitis grave por VRS ocurre en el lactante pequeño entre los 2 y 6 meses de

edad. De hecho se estima que el 70% de los lactantes hospitalizados por bronquiolitis son menores de 6 meses.<sup>4,7,64</sup> Se sabe también que el VRS puede ocasionar cuadros graves en pacientes mayores de 65 años.<sup>4,48,163-165</sup> Por tanto, la menor edad al comienzo de la temporada anual de VRS o en el momento de la infección (sobre todo los menores de 3 meses) así como la infección en ancianos constituyen factores bien definidos de enfermedad grave.<sup>44,61,69,163,164,166</sup> En relación al sexo se observa que los lactantes varones tienen un riesgo 1,5 veces superior de padecer enfermedad grave en comparación con los lactantes de sexo femenino.<sup>7,64</sup>

**1.3.4.3. Patología de base:** Numerosos estudios epidemiológicos han identificado diferentes factores de riesgo de enfermedad grave por VRS.<sup>3,155,167-171</sup> Los pacientes con historia de prematuridad representan el grupo poblacional de mayor riesgo para infección grave, seguidos por los niños con displasia broncopulmonar y cardiopatía congénita, sobre todo aquellos con repercusión hemodinámica. Se ha demostrado que estos pacientes ingresan más, presentan hospitalizaciones más largas, necesitan cuidados intensivos con más frecuencia y tienen tasas de mortalidad más altas que los niños pertenecientes a otros grupos de riesgo.<sup>3,59,157,172</sup> De hecho, en estos pacientes está indicada la administración de anticuerpos monoclonales frente al VRS (palivizumab) durante la estación de invierno, para prevenir el desarrollo de enfermedad grave.<sup>60,167,173-175</sup> No obstante, diferentes estudios han identificado otras patologías de base asociadas a una mayor gravedad clínica, incluyendo la fibrosis quística, trisomía 21, trastornos neuromusculares, inmunodeficiencias congénitas o adquiridas (VIH, tumores hematológicos, trasplante de precursores hematopoyéticos u órganos sólidos), anomalías cromosómicas y malformaciones de la vía aérea superior, entre otras.<sup>2,3,33,58,167,176</sup> Son de especial mención los pacientes inmunodeprimidos, sobre todo los pacientes con trasplante de pulmón y los trasplantados de médula ósea, en los que la mortalidad se eleva hasta el 80%.<sup>177-183</sup>

**1.3.4.4. Otros factores:** Se han descrito otros factores de riesgo sociales, demográficos y ambientales que se han asociado a una mayor gravedad de la enfermedad por VRS, entre los que destacan la asistencia a guardería, la presencia de hermanos pequeños en el entorno familiar, la exposición al humo del tabaco, la historia familiar de asma, el bajo peso al nacimiento o la malnutrición, entre

otros.<sup>3,65,184-186</sup> Además, estos factores de riesgo pueden ser diferentes en los lactantes que viven en áreas rurales o en países en vías de desarrollo, como residir a mayor altitud, la presencia de inodoros con cisterna o la exposición a cocinas de carbón o madera.<sup>5,187,188</sup>

Por último, las coinfecciones virales, presentes en el 11%-44% de los casos,<sup>189-193</sup> también se han propuesto como un factor que podría influir en la gravedad de los niños hospitalizados con ITRI, aunque su papel causal no es del todo claro.<sup>56,190,192,194-200</sup>

Existen, por tanto, numerosas cuestiones sin resolver: ¿por qué, siendo una enfermedad tan prevalente, hay un subgrupo de lactantes, aparentemente sin riesgo, que evolucionará de forma más grave? ¿Qué propicia que algunos niños desarrollen una ITRI grave por VRS, mientras que la mayoría tendrá signos y síntomas leves de bronquiolitis o incluso sólo una infección del tracto respiratorio superior (ITRS) cuando las cepas circulantes son las mismas? Por estos motivos y dado que los niños sanos representan el objetivo principal de la infección por VRS, cada vez más autores sugieren que es necesario centrar el foco de atención no sólo en los niños con comorbilidades sino también en los niños previamente sanos, profundizar en el estudio de otros factores de riesgo hasta ahora desconocidos, mejorar el conocimiento sobre la patogenia de la enfermedad y diseñar nuevas estrategias terapéuticas y preventivas, que hasta ahora se centraban sólo en los grupos de riesgo clásicos.<sup>10,61,201</sup>

Es en este contexto donde propusimos la realización del estudio prospectivo que se detalla a continuación, en el que nos planteamos si la colonización nasofaríngea por bacterias potencialmente patógenas podría ser uno de los factores que pudiera influir o determinar de alguna manera una peor evolución de la infección por VRS en los niños previamente sanos.

## 1.4. LA COLONIZACIÓN BACTERIANA NASOFARÍNGEA: COLONIZACIÓN VS. INFECCIÓN

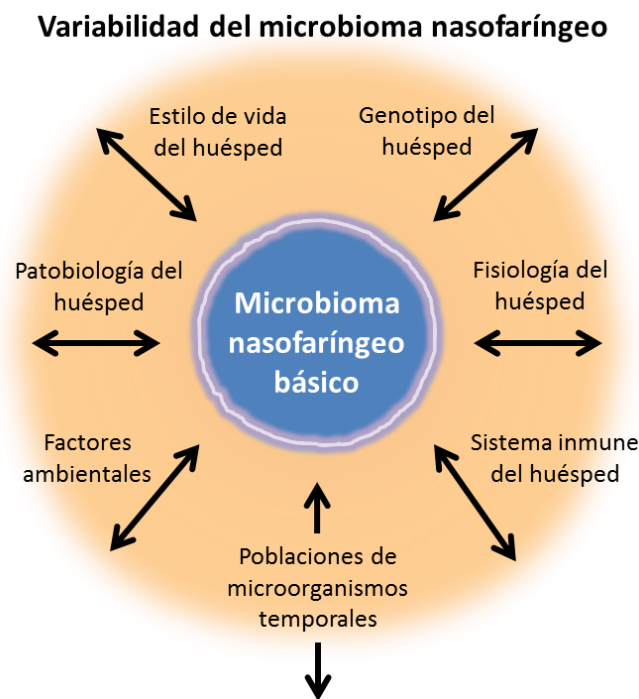
### 1.4.1. Poblaciones bacterianas colonizadoras del tracto respiratorio superior

La nasofaringe constituye un nicho ecológico que sirve de reservorio natural a numerosos microorganismos, cuyo conjunto se denomina “microbiota”.<sup>27,202-205</sup> La mayoría de las bacterias que componen este nicho son bacterias comensales, pero un porcentaje variable lo componen bacterias potencialmente patógenas como *Streptococcus pneumoniae*, cepas no tipificables de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus* del grupo A, entre otras.<sup>206</sup> De hecho, en un estudio realizado en Australia recientemente se observó que el microbioma (el conjunto de la microbiota y sus genes)<sup>26,205</sup> nasofaríngeo durante el primer año de vida está dominado por 6 géneros bacterianos: *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Moraxella* (estos tres primeros más frecuentes durante las infecciones respiratorias agudas), *Staphylococcus*, *Alloiococcus* y *Corynebacterium* (estos tres últimos más frecuentes en niños sanos).<sup>23</sup>

Todas estas bacterias se encuentran en la nasofaringe en un “equilibrio dinámico” sin causar enfermedad. En algunas ocasiones, sin embargo, por factores que aún no son bien conocidos, este equilibrio se pierde y algunas bacterias son capaces de atravesar la mucosa respiratoria, produciendo una infección local que puede extenderse a tejidos contiguos o incluso a órganos periféricos, provocando una infección invasiva y grave.<sup>206-210</sup> Por ello, y puesto que los patógenos respiratorios colonizan la vía aérea superior antes de infectar el pulmón,<sup>211-213</sup> se considera fundamental y de creciente interés científico conocer en profundidad cuál es la composición del microbioma nasofaríngeo humano, a fin de comprender mejor las interacciones microorganismo-huésped y su relación con la salud y la enfermedad.<sup>214,215</sup>

### 1.4.2. Factores que afectan a la colonización nasofaríngea

Existen numerosos factores que influyen en el proceso de la colonización nasofaríngea, incluyendo factores ambientales y socioeconómicos, factores demográficos, el estado de vacunación, la respuesta inmune innata del huésped o las infecciones por virus respiratorios (**Fig. 3**).<sup>13,204,208,209</sup> En general, la colonización aumenta progresivamente desde el nacimiento hasta alcanzar su máximo a los 2-3 años de edad.<sup>216-222</sup> Esta relación podría explicarse por el estrecho contacto entre los lactantes y niños en edad preescolar y por la incompleta maduración de la respuesta inmune.<sup>223</sup>



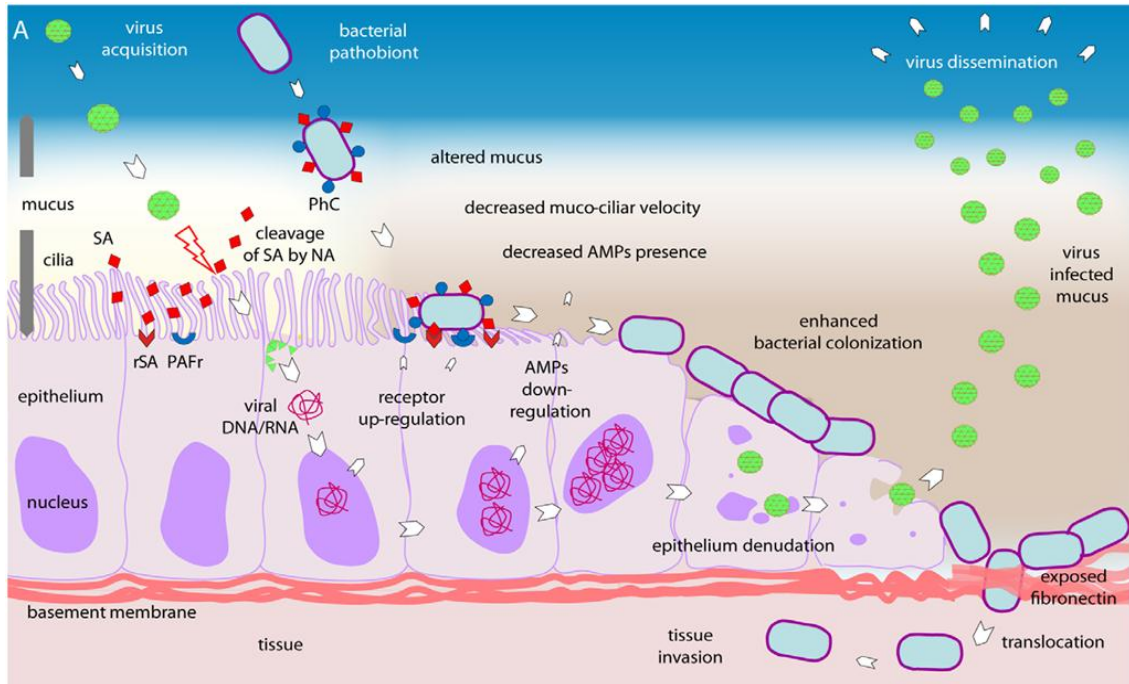
**Figura 3. Variabilidad del microbioma nasofaríngeo:** El núcleo (azul) representa el microbioma de la nasofaringe del ser humano. El núcleo está rodeado por un conjunto de factores representados de forma variable (naranja) que influyen en la composición y densidad del microbioma. Modificado de Turnbaugh et al.<sup>204</sup>

#### 1.4.2.1. Interacciones virus-bacteria

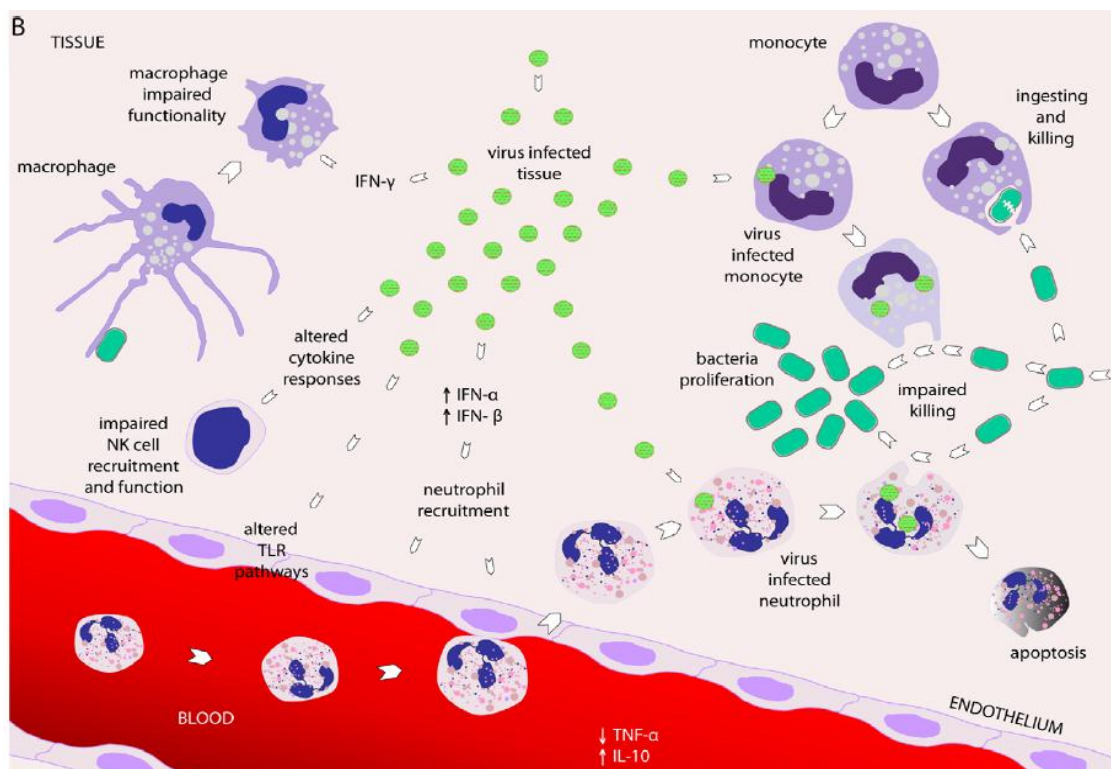
La mayoría de los estudios realizados tanto en humanos como en modelos animales evidencian que los virus pueden alterar el epitelio respiratorio, facilitando la

adherencia bacteriana y posterior sobreinfección bacteriana.<sup>206,223-226</sup> La colonización nasofaríngea es el punto de partida para el desarrollo de enfermedad respiratoria y de diseminación de bacterias potencialmente patógenas a otros individuos a través de las secreciones respiratorias.<sup>206</sup> El evento inicial y fundamental para que se produzca esta colonización es la adhesión de las bacterias potencialmente patógenas al epitelio respiratorio mediante la fijación de proteínas de la superficie bacteriana a los receptores de carbohidratos presentes en la célula del huésped.<sup>227,228</sup> Aunque la base de este proceso es similar en todas las bacterias respiratorias, se ha comprobado que existen diferencias según la especie.<sup>206,229-234</sup> Se han propuesto diferentes mecanismos por los cuales los virus influyen en la colonización y posterior invasión bacteriana. En general, las infecciones virales en el tracto respiratorio superior ocasionan una respuesta inflamatoria caracterizada por lesión de las células epiteliales de la nasofaringe, disfunción de los cilios del epitelio respiratorio, aumento de la viscosidad del moco nasal, aumento de expresión de los receptores epiteliales para bacterias potencialmente patógenas, aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias y reclutamiento de neutrófilos (**Figs. 4 A&B**).<sup>208,235-237</sup> Además, en el caso del aumento de adhesión bacteriana producida por los virus, se ha comprobado que éste no sólo ocurre en el momento de la coinfección simultánea de ambos microorganismos, sino que también puede producirse hasta una semana después de la infección o incluso, en el caso del virus de la gripe, después de la recuperación total de la enfermedad.<sup>208,237</sup>



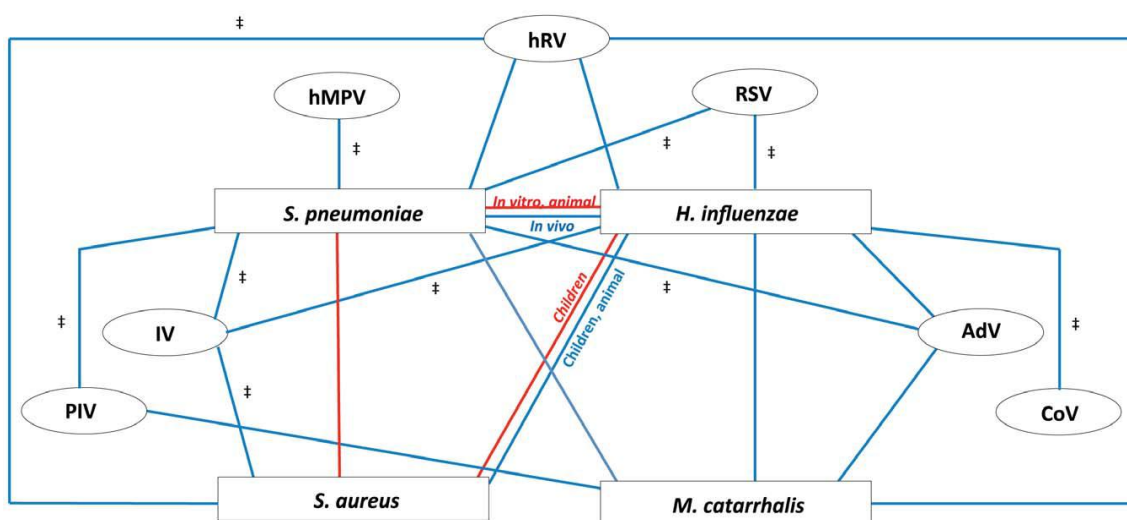


**Figura 4A. Mecanismos a través de los cuales los virus respiratorios favorecen la colonización bacteriana.** Los virus respiratorios podrían predisponer a la colonización bacteriana a través de diferentes mecanismos: 1) Alteración de la superficie de la mucosa y disminución de la función mucociliar del epitelio respiratorio; 2) Disminución de la expresión de péptidos antimicrobianos por parte de las células infectadas como, por ejemplo, la actividad de la neuraminidasa (NA) viral, la cual es capaz de escindir residuos de ácidos siálicos, dando con ello acceso a receptores bacterianos. 3) Inducción de la colonización y la replicación bacterianas, gracias al aumento de receptores necesarios para la adherencia bacteriana como PAFr, CAECAM-1, P5F, ICAM-1 y proteína G. PAFr, receptor del factor activador de plaquetas; ICAM-1, molécula de adhesión intracelular 1; P5F, proteína de la membrana exterior homóloga de fimbrias P5; CAECAM-1, molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario-1; PhC, fosforilcolina; SA, ácidos siálicos; rSA, receptor de ácidos siálicos; NA, neuraminidasa; ARNm, ARN mensajero; AMP, péptidos antimicrobianos. Modificado de Bosch et al.<sup>208</sup>



**Figura 4B. Interacciones virus-bacteria en el epitelio respiratorio en relación con el sistema inmune del huésped.** Los virus también pueden inducir cambios en las funciones del sistema inmunológico que favorecen la invasión bacteriana: 1) Reducción del reclutamiento y funcionalidad de células NK. 2) Inducción de IFN- $\alpha$  y IFN- $\beta$ , afectando al reclutamiento y la funcionalidad de los neutrófilos, y posteriormente induciendo su apoptosis. Inducción de IFN- $\gamma$ , que parece afectar negativamente a la actividad de los macrófagos. Disminución de la eficacia de los monocitos infectados por el virus en la ingestión y la destrucción de las bacterias. 4) Deterioro de las vías TLR, con aumento de producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10, y disminución de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ . Las flechas negras indican un aumento (↑) o disminución (↓) de la actividad o funcionalidad de una citoquina. IFN, interferón; TNF, factor de necrosis tumoral; TLR, receptor tipo “Toll-like”; IL, interleuquina; células NK, células “natural killer”. Modificado de Bosch et al.<sup>208</sup>

Más específicamente, se observa que las tasas de colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis* aumentan en presencia de determinados virus respiratorios.<sup>13,23,208,238,239</sup> Existen estudios que sugieren que es posible que cada virus sea capaz de facilitar de forma específica la presencia de determinadas especies bacterianas o viceversa.<sup>22,198,208,226,240</sup> (Fig. 5). La asociación más conocida es el sinergismo entre la infección por virus influenza y *Streptococcus pneumoniae* o *Staphylococcus aureus*,<sup>13,241-244</sup> que se objetiva clínicamente, sobre todo, en las pandemias de gripe.<sup>13,208,245</sup>



**Figura 5. Modelo propuesto de interacciones bacterianas y virales.** Este modelo representa un resumen de la evidencia científica disponible sobre las interacciones dinámicas que se producen entre bacterias y virus dentro del nicho de la nasofaringe durante episodios asintomáticos. Se muestra información disponible sobre las cuatro principales bacterias potencialmente patógenas (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus* y *M. catarrhalis*) y siete virus respiratorios comunes (rinovirus [HRV], virus respiratorio sincitial [RSV], adenovirus [ADV], coronavirus [COV], virus influenza [IV], los virus parainfluenza [PIV] y metapneumovirus humano [hMPV]). Las líneas rojas representan una asociación negativa entre bacterias (competencia), mientras que las líneas azules representan una asociación positiva (sinergia). Para todas las asociaciones representadas, la evidencia disponible se ha seleccionado de estudios realizados en humanos, a excepción de los indicados con ‡, donde la evidencia sólo está disponible en estudios *in vitro* y/o animales. Modificado de Bosch et al.<sup>208</sup>

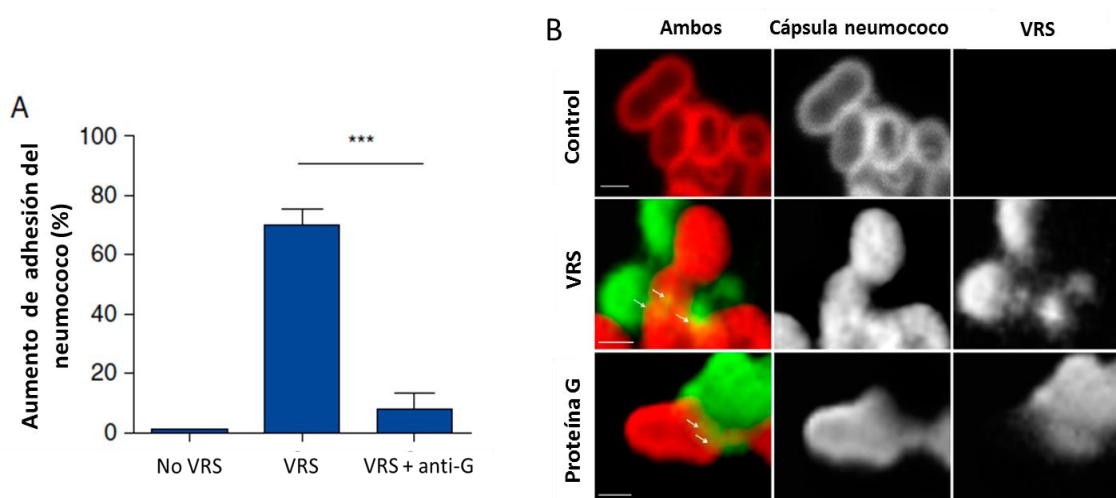
#### 1.4.2.2. El VRS y la colonización bacteriana nasofaríngea

El VRS, específicamente, se ha relacionado con un aumento de la colonización nasofaríngea a través del aumento de la adhesión bacteriana al epitelio respiratorio.<sup>209,226,246,247</sup> Estudios *in vitro* en células epiteliales humanas (en especial la línea celular epitelial HEp-2) e *in vivo* en el modelo murino o el de chinchilla han demostrado que las células infectadas por VRS muestran una mayor adhesión a potenciales patógenos como *Streptococcus pneumoniae*,<sup>246,248,249</sup> *Haemophilus influenzae* no tipificable,<sup>229,247,250</sup> *Haemophilus influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis*,<sup>251,252</sup> *Staphylococcus aureus*,<sup>253</sup> *Bordetella pertussis*<sup>254</sup> y *Pseudomonas aeruginosa*<sup>255,256</sup> que las células no infectadas. Aunque los mecanismos por los que el virus produce una mayor adherencia bacteriana no son del todo conocidos, se sabe

que uno de ellos se asocia a una mayor expresión de glicoproteínas virales en la superficie celular tras la internalización del virus en el epitelio, las cuales actúan como receptores bacterianos.<sup>257</sup>

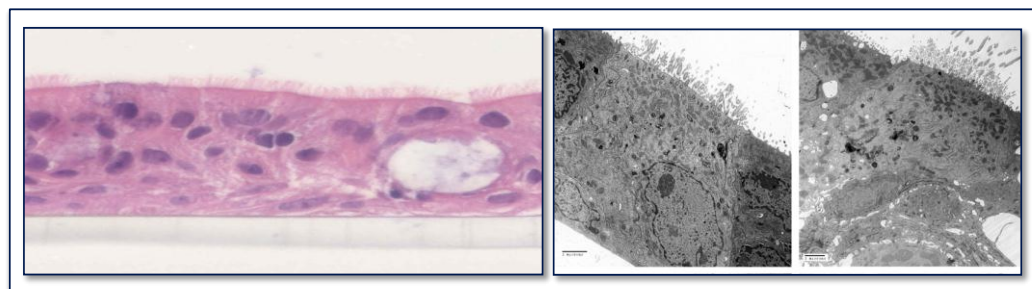
#### 1.4.2.2.1. Estudios experimentales

Se ha comprobado, tanto *in vitro* como en modelos animales, que el VRS puede adherirse directamente a las bacterias a través de las proteínas de la superficie viral, formando un complejo virus-bacteria con mayor capacidad de adhesión a la mucosa respiratoria.<sup>224,258,259</sup> En este sentido, datos recientes han demostrado que la glicoproteína G del VRS es capaz de unirse directamente a la proteína de unión a la penicilina (PBP-1a) de *S. pneumoniae*, aumentando la virulencia bacteriana y respuesta inflamatoria (Fig. 6).<sup>259</sup>



**Figura 6. El VRS se adhiere directamente a *S. pneumoniae* mediante la glicoproteína G de superficie.** A) ELISA que muestra la inhibición de la unión del neumococo a una placa revestida de VRS mediante el previo tratamiento de la placa con un anticuerpo contra la proteína G del VRS (anti-RSV G). B) Imágenes donde se observan neumococos expuestos a albúmina de suero bovino (control), al VRS o a la proteína G del VRS. Las preparaciones bacterianas se tiñeron con un anticuerpo específico para el VRS (verde) y un anticuerpo para la cápsula del neumococo (rojo). Las áreas de colocalización del antígeno se muestran en amarillo (indicado con flechas blancas). Modificado de Smith et al.<sup>259</sup>

En ese mismo estudio,<sup>259</sup> los autores demostraron que las concentraciones de citoquinas y quemocinas en células humanas del epitelio respiratorio *in vitro* eran significativamente mayores en presencia del VRS y *S. pneumoniae* de forma conjunta que de cada uno de estos patógenos de forma aislada (**Fig. 7**).



Chemokine cytokine (pg/ml)	Mock*		RSV*	
	Control†	Pneumococcus†	Control†	Pneumococcus†
IFN- $\gamma$	12 (10–15)	20 (15–20)	17 (14–25)	20 (19–25)
IL-1 $\beta$	2 (2–4)	4 (3–4)	6 (5–12)	5 (4–6)
IL-12p70	2 (2–2)	3 (3–4)	2 (2–3)	4 (3–4)
TNF- $\alpha$	7 (6–8)	10 (10–15)	12 (9–19)	19 (14–19)‡
IL-5	3 (2–3)	4 (4–4)	5 (4–16)	6 (4–6)‡
IL-13	6 (5–7)	10 (8–11)	6 (5–22)	10 (9–11)
CCL11	72 (68–73)	92 (90–93)	68 (63–153)	93 (93–99)
CCL4	1 (1–1)	2 (2–3)	2 (2–12)	3 (3–4)
CCL17	35 (26–36)	48 (48–49)	30 (23–89)	52 (51–58)
CCL22	91 (91–101)	131 (123–138)	141 (122–335)	167 (128–191)
CXCL8	30 (26–62)	98 (83–152)	159 (104–1,319)	271 (93–457)‡

**Figura 7. Concentraciones de citoquinas y quemocinas secretadas en el sobrenadante del cultivo celular tras 2 horas de exposición de *S. pneumoniae* a células epiteliales ciliadas humanas infectadas o no previamente con VRS.** Mock: control, células no infectadas con VRS. RSV: células infectadas con VRS. \*Infección primaria (durante 72 horas). † Infección secundaria (durante 2 h). Los datos se muestran como mediana y rango intercuartil (entre paréntesis). ‡ Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre "Mock-neumococo" (células no infectadas con VRS y posteriormente infectadas con neumococo) y "RSV-neumococo" (células infectadas con VRS y posteriormente infectadas con neumococo). Modificado de Smith et al.<sup>259</sup>

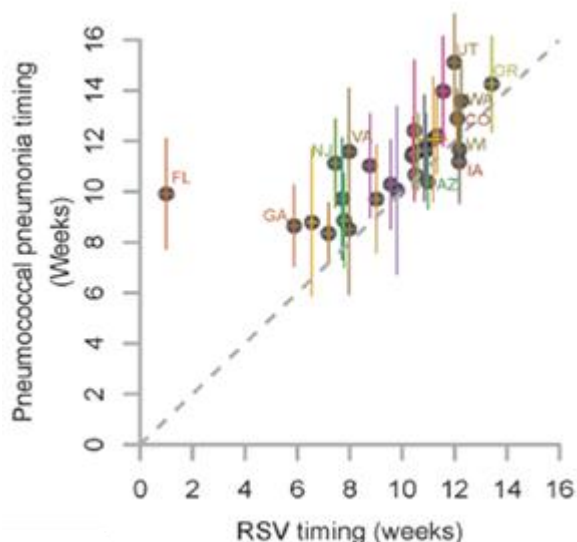


Además, la infección por VRS puede aumentar la liberación de moléculas en la membrana de las células del huésped que también pueden actuar como receptores de adhesión bacteriana.<sup>246</sup> Otros autores demostraron que el VRS aumenta la expresión de moléculas como el CD14 y CD18, implicadas en la mayor adhesión de *Neisseria meningitidis* a las células infectadas por el VRS.<sup>252</sup> Por otra parte, se ha demostrado que la infección previa por VRS puede atenuar la respuesta inmune innata, como las  $\beta$ -defensinas, lo que favorecería la replicación bacteriana.<sup>247</sup>

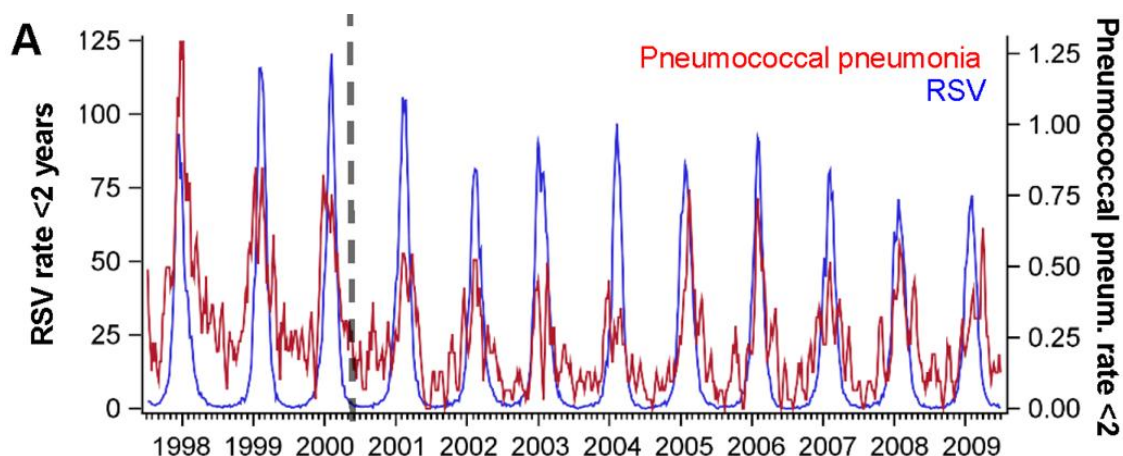
Estudios realizados en ratones demuestran que la infección por el VRS disminuye la eliminación de *S. pneumoniae* de la mucosa respiratoria, lo que produce aumento de la inflamación pulmonar, con agravamiento de la enfermedad respiratoria y una mayor pérdida de peso y mortalidad de los animales infectados.<sup>260,261</sup>

#### 1.4.4.2.2. Estudios epidemiológicos

Numerosos autores han destacado la contribución del VRS a la patogenia de la infección invasiva por *S. pneumoniae* en niños.<sup>262-266</sup> Ampofo et al<sup>264</sup> demostraron, en una cohorte de 435 niños, una asociación clara entre el VRS y la enfermedad invasiva por neumococo, siendo la neumonía el cuadro clínico más frecuente.<sup>264</sup> De hecho, el aumento de las tasas de neumonía coincide habitualmente con los períodos de mayor actividad del VRS.<sup>237,264,267-270</sup> Recientemente, en un estudio realizado en 36 estados de EE.UU. en el que se analizó la interacción entre el VRS y la neumonía por *S. pneumoniae* en niños hospitalizados, se observó que el VRS se asociaba al aumento de neumonía neumocócica, sobre todo en los lactantes menores de 2 meses.<sup>269</sup> Estos autores también evidenciaron una disminución significativa en las tasas de hospitalización por VRS en lactantes menores de un año tras la introducción de la vacuna antineumocócica heptavalente (**Figs. 8 y 9**).



**Figura 8. Relación temporal entre el pico estacional (en semanas) de las hospitalizaciones debidas al VRS y las debidas a neumonía neumocócica en diferentes estados de EE.UU.** Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95%. Los colores muestran los diferentes estados, marcados con etiquetas de dos iniciales. Modificado de Weinberger et al.<sup>269</sup>



**Figura 9. Relación entre la incidencia de infección por el VRS (en azul) y la neumonía neumocócica (en rojo) en niños de California, EE.UU.** RSV: virus respiratorio sincitial. La línea gris separa los periodos en base a la introducción de la vacuna neumocócica. Modificado de Weinberger et al.<sup>269</sup>

La mayoría de los estudios describen una relación unidireccional entre infección viral y colonización bacteriana; sin embargo, es posible que determinadas bacterias puedan crear un ambiente favorable facilitando la invasión viral de manera directa o indirecta.<sup>208,262,271</sup> Por ejemplo, los lactantes colonizados por *M. catarrhalis* o por *S. pneumoniae* a las 5-9 semanas de vida tienden a presentar más precozmente una primera infección del tracto respiratorio superior o inferior, respectivamente, que los lactantes colonizados por otras especies bacterianas.<sup>23</sup> Por otra parte, los propios virus podrían utilizar el microambiente bacteriano para evadir los mecanismos de defensa del huésped, como propugnan los estudios desarrollados por Kane et al<sup>272</sup> y Kuss et al.<sup>273</sup> Mas aún, datos de un estudio en el que se aleatorizaron más de 36.000 niños (aproximadamente 18.000 en cada brazo del estudio) a la vacuna nonavalente anti-neumocócica vs. placebo, demostraron que la vacuna, además de disminuir de forma específica la incidencia de las infecciones invasivas por neumococo, también se asoció a una disminución significativa en la incidencia de neumonías virales.<sup>262</sup> Por tanto, la idea de que únicamente los virus predisponen a la enfermedad bacteriana secundaria o que existe un solo virus o una sola bacteria para cada infección respiratoria es una visión limitada para la complejidad y dinamismo que exhiben estas infecciones.<sup>13,22,198,274</sup>

#### **1.4.5. Colonización bacteriana nasofaríngea en el niño con bronquiolitis aguda y sibilancias producidas por virus**

En general, los datos sobre el impacto de la colonización bacteriana nasofaríngea en las infecciones respiratorias del tracto respiratorio inferior de etiología viral en niños son escasos y existe una gran heterogeneidad en la metodología de los estudios. La mayoría de ellos incluye niños mayores de 2 años, detección de múltiples virus y diferentes definiciones en relación a la infección del tracto respiratorio inferior, lo cual dificulta las comparaciones entre trabajos y la extrapolación de resultados.

Bisgaard y sus colaboradores<sup>275</sup> siguieron una cohorte de 361 hijos de madres asmáticas desde el nacimiento hasta los 3 años y observaron una asociación significativa entre los episodios de sibilancias agudas y la colonización de la hipofaringe



por bacterias respiratorias (OR 2,9; 95% IC [1,9-4,3]), siendo esta asociación similar, pero independiente, a la que se produce con los virus respiratorios. El mismo grupo de investigadores determinó, en la misma cohorte, que la colonización de neonatos al mes de vida por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* o *M. catarrhalis* se relacionaba con una mayor probabilidad de presentar bronquiolitis aguda en los primeros 3 años de vida.<sup>276</sup> Resultados muy similares se demostraron en una cohorte de neonatos sanos.<sup>277</sup> Por otra parte, en un estudio realizado en Turku (Finlandia), los niños menores de 3 años ingresados con el primer episodio de sibilancias de etiología viral (VRS, rinovirus, bocavirus o infecciones mixtas) colonizados por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* o *M. catarrhalis* permanecieron ingresados durante más tiempo y posteriormente presentaron más episodios de sibilancias recurrentes que los niños no colonizados.<sup>18</sup> Por otra parte, Yu et al,<sup>19</sup> en China, observaron que los niños con bronquiolitis aguda estaban colonizados por al menos una bacteria potencialmente patógena en un 56% de los casos. Además, la colonización era mayor en aquellos niños con sibilancias recurrentes inducidas por virus en comparación con los que presentaban el primer episodio de sibilancias y la presencia de bacterias en la nasofaringe se asociaba con una peor evolución clínica.

Hishiki et al<sup>278</sup> encontraron que casi la mitad de los niños menores de 5 años ingresados por una infección del tracto respiratorio inferior por VRS estaban colonizados por bacterias respiratorias potencialmente patógenas, siendo las tres más frecuentes *H. influenzae* (44%), *S. pneumoniae* (36,6%) y *M. catarrhalis* (29,3%).<sup>278</sup> En un interesante trabajo, Hyde y otros investigadores<sup>22</sup> observaron que la presencia específica de Proteobacterias como *H. influenzae* y *M. catarrhalis* en la nasofaringe de niños menores de 2 años se asociaba a bronquiolitis producida por VRS o por VRS y rinovirus de forma conjunta, y a sibilancias durante la infección aguda. Por último, en un reciente estudio sobre el microbioma nasofaríngeo durante el primer año de vida se observó que los niños con infección del tracto respiratorio inferior producida por VRS que estaban colonizados por *M. catarrhalis* experimentaban más fiebre.<sup>23</sup>

## 1.5. COMENTARIOS FINALES A LA INTRODUCCIÓN

Por tanto, existe una evidencia creciente que indica que las bacterias potencialmente patógenas del tracto respiratorio superior, fundamentalmente de la nasofaringe, podrían tener un papel en el desarrollo y/o la evolución de las enfermedades respiratorias más importantes de los niños. Sin embargo, se desconoce aún si el hecho de encontrar estas bacterias en la vía aérea superior implica causalidad y/o diferencia entre colonización o enfermedad.<sup>18,279</sup> Es indudable que las interacciones microbianas en la nasofaringe son multifactoriales e implican a su vez complejas interacciones entre factores del huésped y las propias características bacterianas, las cuales, en el contexto de la infección por el VRS, son aún más difíciles de evaluar e interpretar y pueden tener consecuencias importantes tanto para la composición y la estabilidad de la propia microbiota como para la susceptibilidad a la enfermedad.

En resumen, la infección por el VRS continúa siendo una patología pediátrica líder a nivel mundial, con una enorme repercusión socio-económica y sanitaria, que afecta gravemente y de forma mayoritaria a niños sanos sin que se lleguen a entender completamente los factores que determinan la gravedad de la enfermedad. Al igual que se ha demostrado para otros virus, como el virus influenza, el VRS se relaciona íntimamente con las poblaciones bacterianas del tracto respiratorio, lo que podría predisponer a sobreinfecciones bacterianas y probablemente, en última instancia, a una mayor gravedad de la enfermedad respiratoria. Numerosos estudios sugieren que el origen de esta cascada de eventos podría comenzar a nivel de la nasofaringe, con la interacción de bacterias potencialmente patógenas en la mucosa respiratoria infectada por el VRS.

## **CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

### 2.1. JUSTIFICACIÓN

1.- La bronquiolitis por VRS constituye la primera causa de hospitalización en niños menores de 2 años a nivel mundial. La mayoría de niños hospitalizados con bronquiolitis por VRS son previamente sanos sin factores de riesgo conocidos; de ellos un 10%-20% precisará ingreso en la UCIP.

2.- Estudios *in vitro*, modelos experimentales y estudios epidemiológicos sugieren una asociación entre la infección por el VRS y la colonización nasofaríngea por bacterias potencialmente patógenas, específicamente por *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* y *S. aureus*.

3.- Aunque se ha empezado a estudiar el papel de la colonización bacteriana nasofaríngea en niños sanos y con infecciones respiratorias, existen pocos estudios que se centren específicamente en la bronquiolitis aguda por VRS y su posible asociación con una mayor gravedad clínica.

4.- En la mayoría de los trabajos realizados, los pacientes con infección por VRS presentan rangos de edades muy amplios. Hasta el momento no se ha examinado en profundidad el impacto de la colonización nasofaríngea en el grupo de edad de más relevancia en la bronquiolitis, los niños menores de 24 meses de edad.

5.- En la actualidad no existe evidencia científica suficiente que demuestre si la presencia de estas bacterias potencialmente patógenas en la nasofaringe de los niños infectados por VRS influye o afecta de alguna manera al desarrollo y la gravedad de la bronquiolitis o modifica la respuesta inflamatoria local (nasal) o sistémica.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



### 3.1. HIPÓTESIS

Revisada en profundidad la bibliografía y el actual conocimiento sobre esta patología, presentamos la siguiente hipótesis de trabajo:

“Los niños menores de 2 años, y especialmente los menores de 12 meses de edad, previamente sanos hospitalizados con un primer episodio de bronquiolitis por VRS están colonizados frecuentemente por bacterias potencialmente patógenas en la nasofaringe, lo que induciría una respuesta local y sistémica de células inflamatorias. Además, la colonización por los principales patógenos respiratorios *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* podría influir en la evolución clínica y/o la gravedad de la enfermedad en estos niños con bronquiolitis por VRS”.

### **3.2. OBJETIVOS**

#### **3.2.1. Objetivos principales**

- 1.- Describir si los niños menores de 2 años hospitalizados con un primer episodio de bronquiolitis por VRS, sin factores de riesgo conocidos, están colonizados por bacterias potencialmente patógenas en la nasofaringe.
- 2.- Definir si los niños menores de 2 años hospitalizados con un primer episodio de bronquiolitis por VRS presentan una colonización nasofaríngea diferente a la de los controles sanos comprendidos en el mismo rango de edad.
- 3.- Identificar si los niños menores de 2 años hospitalizados con un primer episodio de bronquiolitis por VRS colonizados por bacterias potencialmente patógenas presentan una evolución clínica diferente que los niños con bronquiolitis por VRS no colonizados por bacterias potencialmente patógenas.
- 4.- Determinar si los niños menores de 2 años hospitalizados con un primer episodio de bronquiolitis por VRS colonizados por bacterias potencialmente patógenas presentan una respuesta inflamatoria local y sistémica diferente que los niños hospitalizados con bronquiolitis por VRS que están colonizados por flora respiratoria bacteriana.

#### **3.2.2. Objetivos secundarios**

- 1.- Determinar el efecto antibiótico en la colonización bacteriana nasofaríngea así como comparar la evolución clínica en lactantes hospitalizados por bronquiolitis por VRS expuestos o no a antibióticos.
- 2.- Estudiar si los parámetros epidemiológicos incluyendo la vacunación, exposición a tabaco o lactancia materna, influyen en las tasas de colonización bacteriana nasofaríngea en los pacientes con bronquiolitis por VRS colonizados.

3.- Valorar si la densidad de bacterias en la nasofaringe se asocia de forma proporcional a las concentraciones de citoquinas proinflamatorias medidas en el suero de estos pacientes.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

#### 4.1. DISEÑO Y CANDIDATOS DEL ESTUDIO

##### 4.1.1. Descripción y localización del estudio

Este estudio consiste en un estudio observacional prospectivo de cohortes en niños previamente sanos menores de 2 años ingresados por bronquiolitis aguda producida por VRS en un único hospital terciario (Hospital Nationwide Children's de Columbus, Ohio, EE.UU.) durante la temporada anual de bronquiolitis aguda ocurrida entre 2010-2011, para determinar la frecuencia y el impacto de la colonización bacteriana nasofaríngea en relación con la gravedad de la enfermedad. Además, se reclutó una cohorte de controles sanos de edad y sexo semejantes.

El campus del hospital Nationwide Children's (NCH) comprende el Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Ohio State, el hospital Nationwide Children's, las instalaciones de los Servicios de Investigación Clínica y el Instituto de Investigación. El NCH es un hospital pediátrico de tercer nivel con 552 camas que atiende a una población de más de un millón de niños y adolescentes cada año. En el año 2010 en este hospital se llevaron a cabo 19.020 altas hospitalarias, 19.758 intervenciones quirúrgicas y se documentaron 76.847 visitas al Servicio de Urgencias. Además, el NCH abarca a una gran red de centros de Atención Primaria, en los que en el año 2010 se atendieron a 158.713 pacientes de 0 a 19 años de edad.

La investigación clínica se coordina a través de los Servicios de Investigación Clínica del NCH donde se estudia el diseño, desarrollo y viabilidad de los proyectos de investigación. El Instituto de Investigación, con una ocupación de más de 61.000 m<sup>2</sup> de edificios con laboratorios y oficinas, ha sido reconocido como uno de los 10 centros pediátricos de investigación de EE.UU. que reciben más financiación del NIH ("National Institutes of Health") y es uno de los institutos de investigación pediátrica con mayor crecimiento y proyección de los EE.UU. El proyecto que llevamos a cabo se realizó en conjunto con el hospital (NCH), donde se reclutaron los pacientes, y el Centro de Vacunas e Inmunología, que se encuentra en el Edificio II del Instituto de Investigación del NCH, en los laboratorios de los Doctores Mejías y Ramilo. Los laboratorios donde se realizaron los ensayos y análisis de las muestras del estudio constan de 80 m<sup>2</sup> y están

equipados con cuatro campanas de flujo laminar de nivel de contención BL2 (nivel de bioseguridad 2), dos incubadoras para cultivos tisulares, un contador de células, microscopios, frigoríficos, congeladores, centrifugadoras, termocicladores de PCR y otras herramientas de pequeño tamaño. Además, hay cuatro estaciones de trabajo equipadas con SPSS, SAS, Sigma Plot y Graph Pad, exclusivamente dedicadas al análisis estadístico y de microarrays.

#### 4.1.2. Definiciones

- **Bronquiolitis aguda:** Infección aguda del tracto respiratorio inferior caracterizada por aumento del esfuerzo respiratorio (taquipnea y/o uso de musculatura respiratoria accesoria) y sibilancias o crepitantes en la que se sospecha o se identifica un patógeno viral respiratorio en menores de 24 meses.<sup>31,280</sup> En la mayoría de los casos durante la época epidémica es ocasionada por el VRS.

- **Colonización por bacterias potencialmente patógenas:** detección mediante cultivo bacteriano convencional en muestras nasofaríngeas de al menos una de las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* o *Neisseria meningitidis*.<sup>17,206,281</sup>

- **Fiebre:** definida como la temperatura axilar  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  identificada en al menos una ocasión, desde el primer día de enfermedad y hasta el alta.

- **Exposición a antibióticos:** definida por haber recibido al menos una dosis de antibióticos dentro de la semana antes de la recogida de muestras (momento de inclusión en el estudio).

- **Citoquinas:** proteínas de bajo peso molecular secretadas por diferentes tipos celulares y con función inmunorreguladora. En este estudio se analizaron citoquinas relacionadas con la respuesta inmune innata, específicamente la IL-6, la IL-8 y el TNF- $\alpha$  en el plasma.



#### 4.1.3. Pacientes

##### 4.1.3.1. Criterios de inclusión

- Niños menores de 2 años, de ambos sexos y cualquier raza/grupo étnico hospitalizados en el NCH.
- Previamente sanos.
- Hospitalizados con un primer episodio de bronquiolitis aguda producida por VRS.

##### 4.1.3.2. Criterios de exclusión

- Edad gestacional < 35 semanas.
- Enfermedades crónicas o congénitas: cardiopatía congénita, displasia broncopulmonar, insuficiencia renal crónica, miopatías, etc.
- Síndrome de Down y otros síndromes congénitos.
- Diagnóstico de bronquiolitis aguda producida por otros virus distintos del VRS (ej. virus parainfluenza, rinovirus, metapneumovirus humano, etc.).
- Utilización de inmunomoduladores o corticoides sistémicos (vía oral o intravenosa) en las dos semanas anteriores al ingreso hospitalario.
- Inmunodeficiencias congénitas o adquiridas.
- Hospitalización previa por bronquiolitis aguda.

#### 4.1.4. Controles sanos

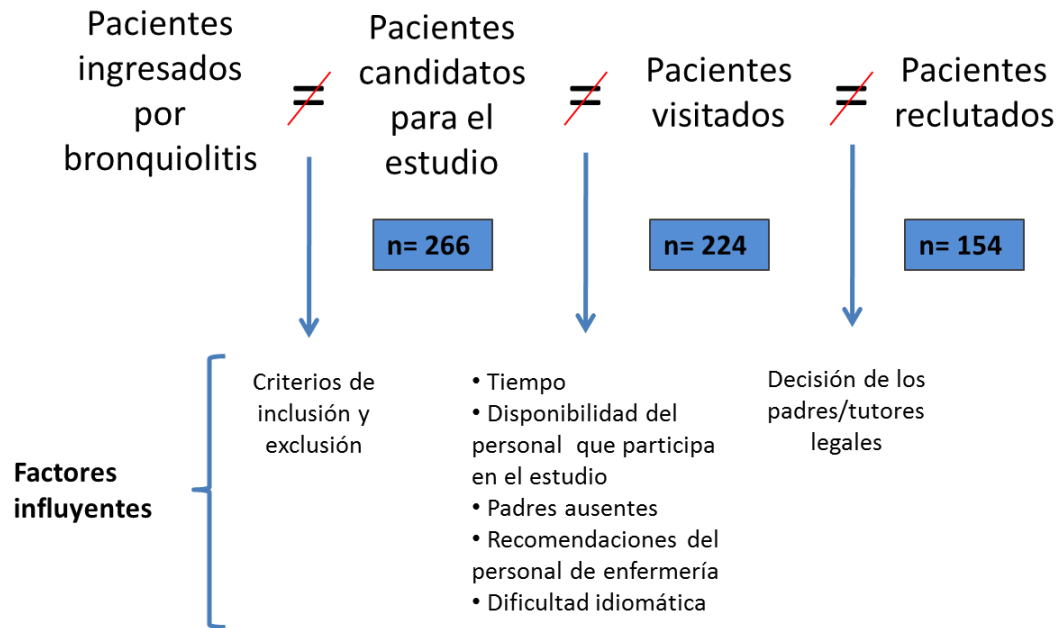
Para identificar las diferencias en la colonización bacteriana nasofaríngea entre controles sanos no infectados y niños con bronquiolitis aguda de edades similares, se reclutó una cohorte de niños sanos menores de 2 años. Los controles sanos fueron reclutados, o bien en el quirófano, cuando acudían a cirugías menores programadas por procedimientos quirúrgicos que no implicaban el tracto respiratorio (ej. hernias), o bien en los centros de salud de Atención Primaria, cuando acudían a citas programadas de atención al niño sano.

## 4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PACIENTES Y RECLUTAMIENTO

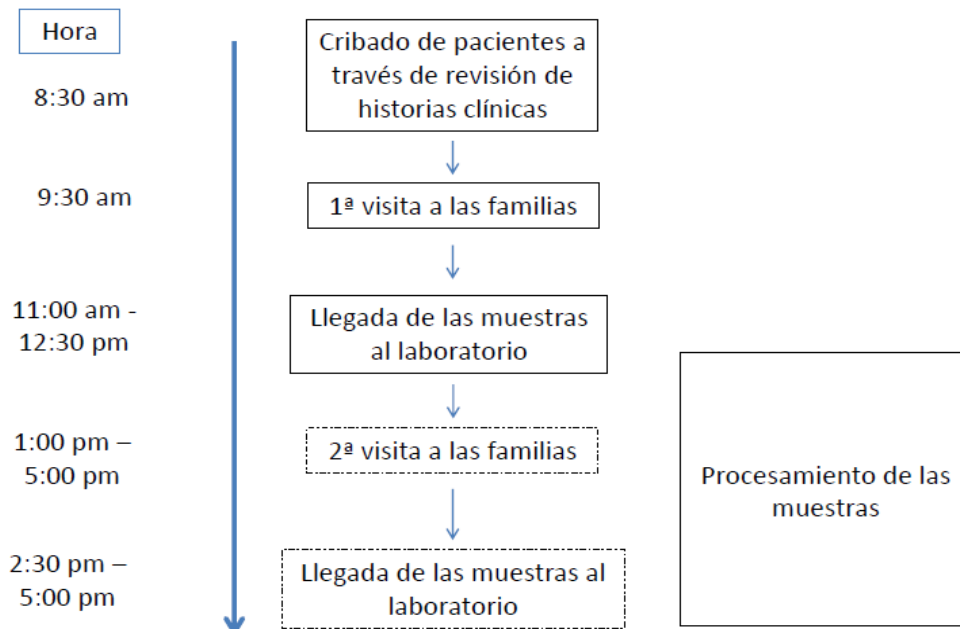
### 4.2.1. Proceso de identificación, selección y reclutamiento

El estudio se inició el 1 de diciembre de 2010 y finalizó el 31 de julio de 2011 en el hospital Nationwide Children's de Columbus, Ohio, EE.UU. Para poder cumplir los objetivos mencionados establecimos un protocolo de identificación y selección de los pacientes hospitalizados por bronquiolitis, que no tuvieran ninguna patología de base y que fueran menores de dos años. La identificación de los pacientes se realizó diariamente, de lunes a viernes, revisando las historias clínicas de los pacientes ingresados, según el censo hospitalario, tanto en la planta de hospitalización de Pediatría como en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP), para determinar cuáles cumplían los requisitos para el estudio. La identificación de los controles se realizó de forma similar, según los partes de quirófano y las citas programadas de los niños en el centro de salud.

Se aceptaron como posibles candidatos aquellos que cumplían los criterios de inclusión y que no presentaban ningún criterio de exclusión, incluyendo también a aquellos niños con bronquiolitis aguda menores de 2 años en el pico de la temporada epidémica de VRS en los que el índice de sospecha de infección por VRS era elevado pero en el momento del reclutamiento se desconocía el resultado del test respiratorio viral. Una vez identificados los pacientes se informaba del estudio a los padres/tutores legales requiriendo la firma de un consentimiento informado (**ANEXO A**) en el caso de que accedieran a participar en el estudio (**Figs. 10 y 11**).



**Figura 10. Identificación, selección y reclutamiento de los participantes: “Porque 2 más 2 no son siempre 4...”.**



**Figura 11. Reclutamiento de los participantes. Gestión del tiempo.**

El diagnóstico de bronquiolitis por VRS se realizó en base al test diagnóstico solicitado por el médico responsable del ingreso del paciente, de acuerdo al protocolo de atención hospitalaria establecido (test rápido antigénico para VRS, EIA; inmunofluorescencia directa, IFD; o panel de virus mediante reacción en cadena de la polimerasa, panel PCR):

- a) El test rápido antigénico (EIA) para el VRS durante nuestro estudio demostró una sensibilidad del 70%-80%.
- b) El test de IFD que se realizó de rutina en el momento del estudio permitía la detección de 6 virus diferentes con sensibilidades que oscilan entre 65% y >90% (VRS, >90%; influenza A y B, 80% a 85%; parainfluenza y metapneumovirus, 70% a 80%; adenovirus, 65% a 70%).
- c) El panel de PCR en tiempo real para virus incluyó PCR individuales para VRS, influenza A y B, metapneumovirus, parainfluenza, adenovirus y rinovirus con una sensibilidad > 98%.

En todos los niños reclutados, independientemente de que presentaran al ingreso un resultado positivo para VRS mediante las técnicas anteriormente descritas, y también en los controles sanos se realizó PCR en tiempo real para VRS en secreciones nasofaríngeas para confirmar el diagnóstico de infección por VRS, determinar de forma cuantitativa la carga viral y definir el tipo de infección por VRS, A o B.

#### 4.2.2. Aprobación del Comité de Ética

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nationwide Children's (*"Institutional Review Board, IRB, at Nationwide Children's Hospital"*) con el número IRB10-00028; (nivel de riesgo 1: *"no greater than minimal risk"*; 45 CFR 46.404; 21 CFR 50.51; **ANEXO B**). La información revelada y obtenida a través de los participantes del estudio es considerada confidencial y fue tratada así en todo momento, tal y como se estipula en el Informe Belmont, el Comité Internacional de la Declaración de Armonización de Buenas Prácticas Clínicas y la Declaración de Helsinki. Los sujetos fueron identificados con un código que protegía su identidad (conocido

sólo por los investigadores del estudio) de manera que en caso de publicación de los resultados no se revelara la identidad de los pacientes. Los participantes que habían aceptado su inclusión en el estudio podían revocar el consentimiento en cualquier momento.

### 4.3. RECOGIDA DE DATOS

Después de obtener el consentimiento informado, se recogieron una serie de datos mediante un cuestionario clínico en el momento de la inclusión en el estudio y la revisión al alta de la historia clínica.

#### 4.3.1. Variables del estudio

**4.3.1.1. Características demográficas y epidemiológicas:** sexo, edad, raza o grupo étnico, edad gestacional, estado vacunal, lactancia materna en el momento del reclutamiento, exposición al humo del tabaco, asistencia a guardería y/o contacto con uno o más hermanos en edad escolar, tratamiento antibiótico recibido en la semana anterior a la inclusión en el estudio y duración del mismo, días de síntomas previos al ingreso incluyendo fiebre.

**4.3.1.2. Determinantes de gravedad de la enfermedad:** la gravedad de la enfermedad se evaluó mediante la consideración de la duración y la presencia de fiebre, duración de la estancia hospitalaria (definido como un día de calendario pasado en el hospital), mínima saturación basal de oxígeno (O<sub>2</sub>) al ingreso, necesidad y duración de oxígeno suplementario (definiendo la duración como el número de horas o porción de las mismas en tratamiento con O<sub>2</sub>, expresado posteriormente en días), necesidad y duración del tratamiento en la UCIP, y necesidad y la duración de intubación o soporte ventilatorio no invasivo. Además, se utilizó una escala estandarizada para determinar la gravedad clínica de la enfermedad (CDSS, “*clinical disease severity score*”), compuesta por cinco parámetros puntuados individualmente desde 0 (normal) a 3 (grave), con el que se clasificó a los pacientes con enfermedad leve (0-5), moderada (6-10) o grave (11-15) (**Tabla 1**).<sup>100,148,282</sup>

Parámetros	0	1	2	3
Sat O2 basal (cianosis)	>95% No cianosis	92-95%	<92% o necesidad de O2 suplementario	Intubado/CPAP FiO2>35%
Frecuencia respiratoria (r.p.m)	<6 m. >6 m. <40 <30	<6 m. >6 m. 41-55 31-45	<6 m. >6 m. 56-70 46-60	<6 m. >6 m. >70 >60
Retracciones/Tiraje	NO	Subcostal (leve)	Subcostal/Intercostal (moderado)	Subcostal/Intercostal/Supraesternal (grave)
Auscultación	Normal	Subcrepitantes o roncus	Sibilancias	Sibilancias ex/inspiratorias audibles sin fonendo o ausencia de ventilación
Actividad	Normal, alerta	Anormal, irritable, disminución de la ingesta de líquidos	Necesidad de fluidos IV o alimentación por SNG	Intubado

**Tabla 1. Valoración clínica de la gravedad de la enfermedad por VRS (*Clinical Disease Severity Score*; CDSS).** Sat O2: saturación de oxígeno; CPAP: presión positiva continua en la vía aérea/CPAP; FiO2: fracción inspirada de oxígeno; r.p.m.: respiraciones por minuto; m.: meses; IV: intravenoso; SNG: sonda nasogástrica.

**4.3.1.3. Parámetros de laboratorio y microbiológicos:** hemograma con diferencial, cultivos de sangre y orina obtenidos a discreción del médico a cargo del paciente.

**4.3.1.4. Hallazgos radiológicos:** en los pacientes en los que se realizó radiografía de tórax, los hallazgos radiológicos fueron revisados de forma independiente por un radiólogo que desconocía el estado clínico de los pacientes. Los patrones radiológicos se agruparon en cuatro categorías: (a) sin hallazgos patológicos, (b) engrosamiento de la pared bronquial y/o hiperinsuflación, (c) marcas intersticiales y/o atelectasia y (d) consolidación lobar.

En cuanto a los datos de laboratorio y radiológicos, sólo se incluyeron para su análisis las pruebas realizadas al paciente el día de su inclusión en el estudio o dentro de las 24 horas anteriores o posteriores a él.

#### 4.4. RECOGIDA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS: METODOLOGÍA DE LABORATORIO

En todos los pacientes y los controles sanos se obtuvieron las siguientes muestras en el momento de la inclusión en el estudio, tras la firma y obtención del consentimiento informado: muestras respiratorias (frotis nasofaríngeo y lavado nasal) y una muestra de sangre periférica.

##### 4.4.1. Muestras respiratorias

##### 4.4.1.1. Frotis nasofaríngeo

Para la recogida de las muestras nasofaríngeas para cultivo bacteriano se utilizaron hisopos flexibles de fibras de nylon (*nylon flocked swab*; ESwab® 482C, Copan Diagnostics, Inc.). Tras la realización del frotis se introdujeron en un tubo que contenía 1 ml de un medio específico de conservación (“líquido Amies modificado”). Estos hisopos están compuestos de hebras de fibra de nailon cortas con aspecto de cepillo para mejorar la recolección de células y crear una capa absorbente fina, de tal forma que la totalidad de la muestra se mantiene cerca de la superficie para una elución rápida y completa en el líquido. El medio mantiene la conservación y viabilidad de las bacterias a temperatura ambiente hasta 48 horas tras la recolección de la muestra. Además, la elución de las muestras en esta solución aumenta la sensibilidad del cultivo bacteriano (**Fig. 12**).



**Figura 12.** Hisopo flexible de nailon utilizado para el estudio (ESwab® 482C, Copan Diagnostics, Inc.). Adaptado de: <http://www.copanusa.com/products/collection-transport/eswab/>

#### 4.4.1.1.1. Procedimiento

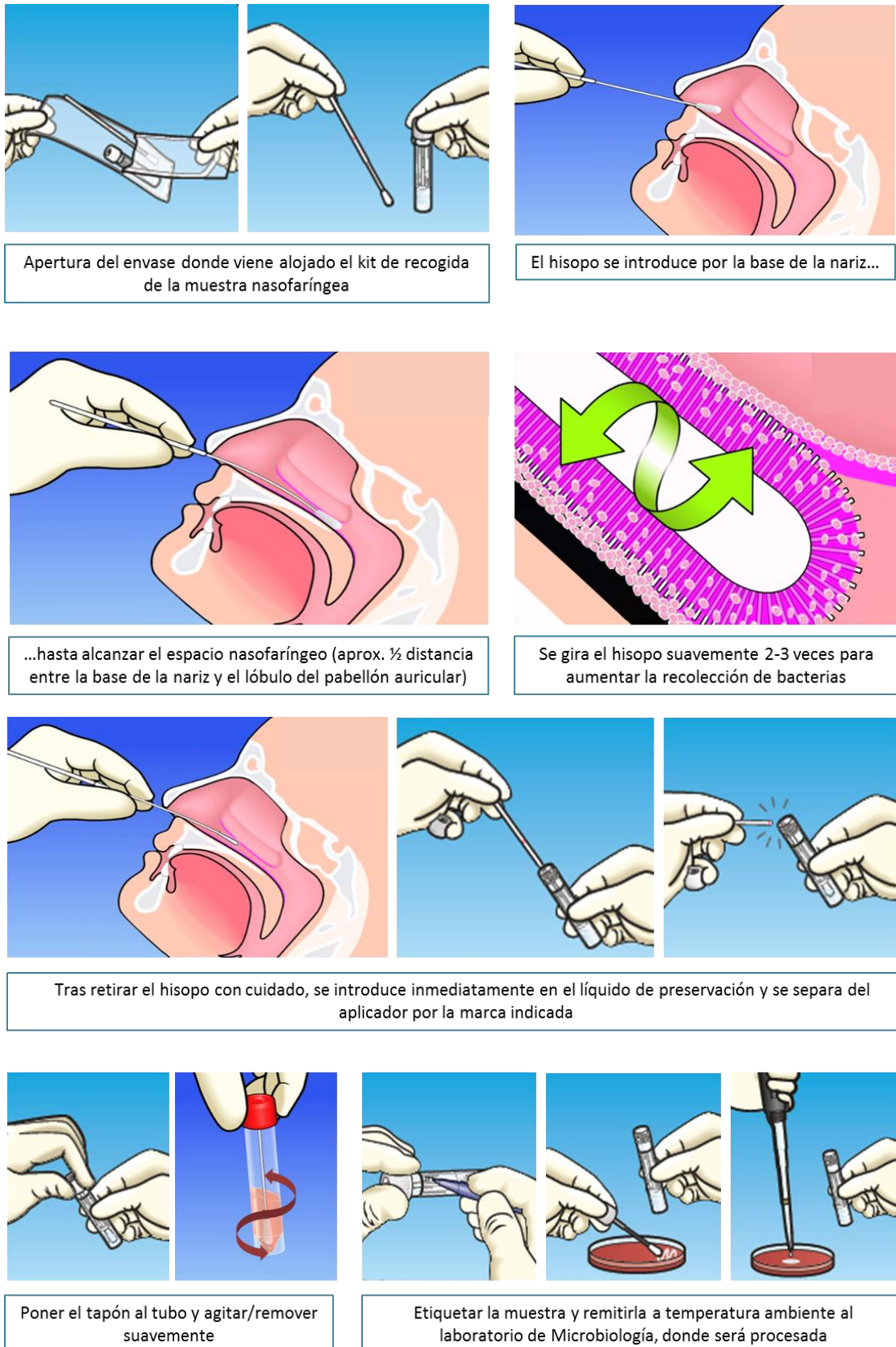
El procedimiento del frotis nasofaríngeo se resume en la **figura 13**. Brevemente:

1. Manteniendo al paciente con la cabeza ligeramente inclinada hacia atrás, se introduce el hisopo horizontalmente a través de la base de una de las narinas hasta una profundidad aproximada a la mitad de la distancia que existe entre la base de la nariz y el lóbulo del pabellón auricular. A esa distancia (espacio nasofaríngeo posterior) se gira suavemente el hisopo 2-3 veces, y posteriormente se retira con cuidado.

2. Inmediatamente, el hisopo se introduce en el tubo que contiene el medio de conservación, se separa el aplicador del hisopo por la parte marcada para tal efecto y se cierra con el tapón. El tubo se agita suavemente para que la muestra se diluya adecuadamente en el líquido.

3. Posteriormente, se etiqueta el tubo con el código del estudio asignado al sujeto y se mantiene a temperatura ambiente hasta que es transportado al laboratorio de Microbiología, dentro de las  $3 \pm 1$  horas tras la extracción de la muestra, para su procesamiento inmediato.





**Figura 13. Realización del frotis nasofaríngeo.** Adaptado de:  
<http://www.copanusa.com/education/videos> y  
[http://www.copanusa.com/files/1014/2358/9284/Eswab\\_Pictorial\\_Instruction\\_Guide\\_.pdf](http://www.copanusa.com/files/1014/2358/9284/Eswab_Pictorial_Instruction_Guide_.pdf)

#### 4.4.1.1.2. Medios de cultivo y medición de la densidad bacteriana

Una vez en el laboratorio de Microbiología, las muestras se sembraron en diferentes medios enriquecidos preparados (BD Diagnostic System®) para el crecimiento bacteriano, utilizados específicamente para el estudio, entre los que se incluyen:

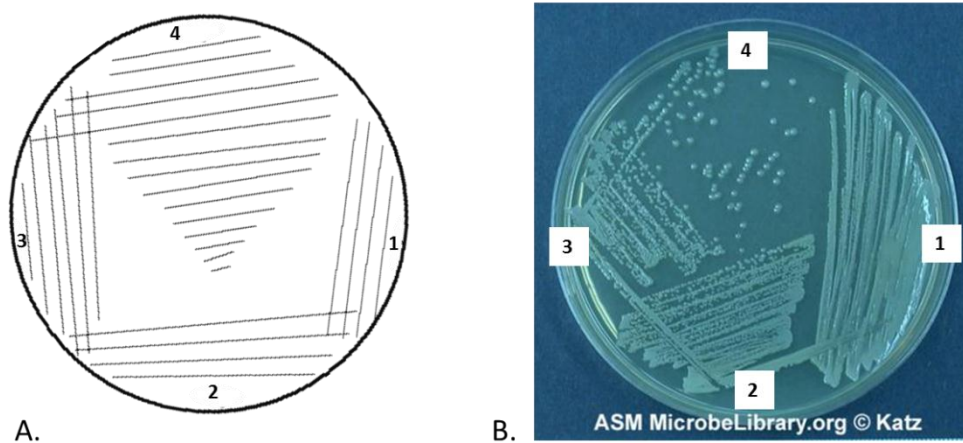
- Agar Tripticasa de Soja con 5% de sangre de carnero (*Trypticase Soy Agar with 5% sheep blood*, TSA II) para *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*).
- Agar Chocolate II con hemoglobina y isovitalex (*Chocolate II Agar with hemoglobin and isovitalex*) para *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*.
- Agar de identificación de *Haemophilus* con bacitracina (*Haemophilus isolation agar with bacitracin*) para *Haemophilus spp.*
- Agar de Thayer-Martin modificado (*Modified Thayer Martin agar*; MTM II) para *Neisseria meningitidis*.

Todas estas placas de Petri fueron colocadas en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 35 °C durante 3 días, momento en el cual se realizó la lectura.

Además, las muestras se sembraron en placas con Agar sangre de cordero al 5% anaerobio CDC (*CDC Anaerobe 5% Sheep Blood Agar*) y posteriormente se colocaron en una cámara de anaerobiosis durante 5 días, para aumentar el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico.

También se realizó una medición semicuantitativa de la densidad bacteriana de los cultivos (colonias aisladas), mediante el “sistema de siembra por agotamiento en 4 cuadrantes”, el cual establece 4 categorías según las colonias presentes en la placa de Petri: 1) escasas (<10 colonias/placa en el primer cuadrante); 2) pocas/algunas ( $\geq 10$  colonias/placa en el primer cuadrante); 3) moderadas (crecimiento en el primer y

segundo cuadrantes); y 4) abundantes (crecimiento desde el primer hasta el tercer cuadrante o más) (Fig.14).<sup>283</sup>



**Figura 14. Sistema de siembra por agotamiento en 4 cuadrantes (four-quadrant streak plate).** A) Representación esquemática del método. B) Ejemplo de aislamiento en el 4º cuadrante: *Staphylococcus aureus* en placa de Agar Trypticase de Soja. Adaptado de: A) <http://www.maltosefalcons.com/tech/yeast-propagation-and-maintenance-principles-and-practices>; B) <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3150-streak-plate-quadrant-streak-four-sector>.

#### 4.4.1.2. Lavado nasal

##### 4.4.1.2.1. Procedimiento

Después de realizar el frotis nasofaríngeo, se efectuó en todos los participantes un lavado nasal, de acuerdo a métodos previamente establecidos en otros estudios.<sup>128,133,284,285</sup> Brevemente, el procedimiento consiste en varios pasos:

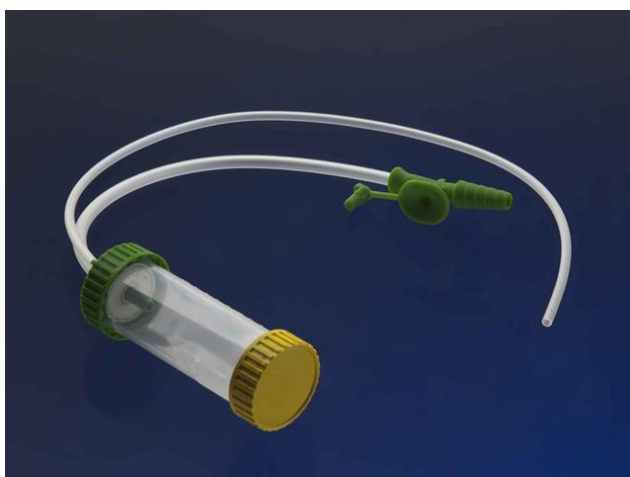
1. Se instilan 1,5 ml de suero salino fisiológico en cada una de las narinas.

2. Manteniendo al paciente con la cabeza ligeramente inclinada hacia atrás, se introduce un catéter flexible fino (de 8 o 10 French) conectado a un recipiente para contener secreciones respiratorias (*mucus trap*, Centurion Medical Products) (Fig. 15) por una de las narinas hasta una profundidad de 3-5 cm, según el tamaño de la cabeza del niño. Posteriormente, el catéter se va retirando progresivamente durante 3-4 segundos mientras se realiza una aspiración continua (80-100 mmHg), utilizando un

movimiento rotatorio suave. El mismo paso se repite introduciendo el catéter por la otra narina.

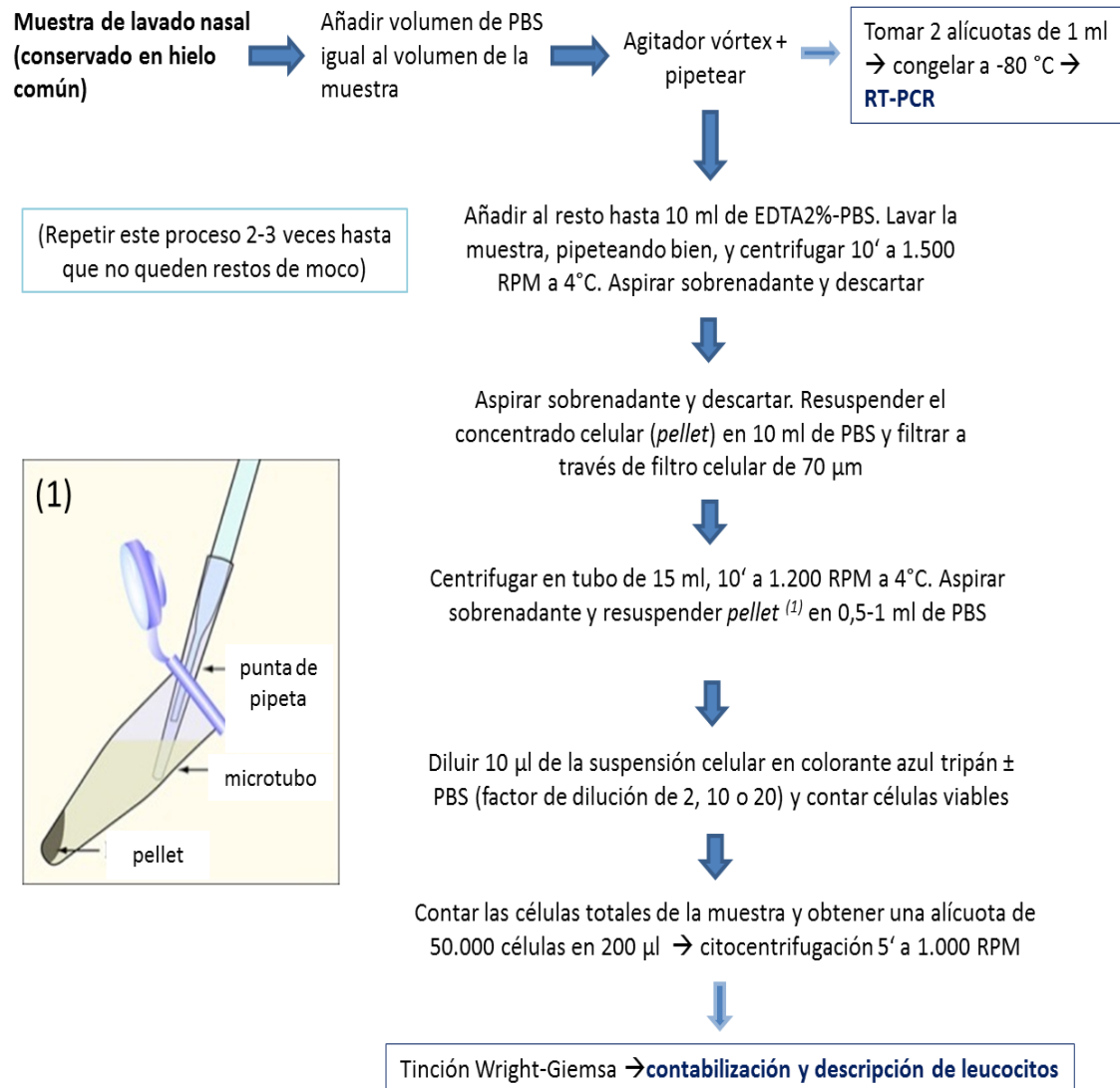
3. Se aspiran 2 ml de medio de transporte de virus a través del catéter para poder enjuagar el mismo y extraer las secreciones que pueden haber quedado retenidas en él.

4. Finalmente, se desconectan las tubuladuras de la succión y se cierra el recipiente con el tapón provisto para ello. La muestra se conserva en hielo común, a 4°C, hasta su procesamiento inmediato en el laboratorio.



**Figura 15. Recipiente contenedor de secreciones respiratorias (Centurion Medical Products). Tomado de [www.medline.com](http://www.medline.com)**

Cada muestra de lavado nasal se procesó y dividió en diferentes alícuotas para realizar el recuento de leucocitos e identificación y cuantificación del VRS (**Fig. 16**).



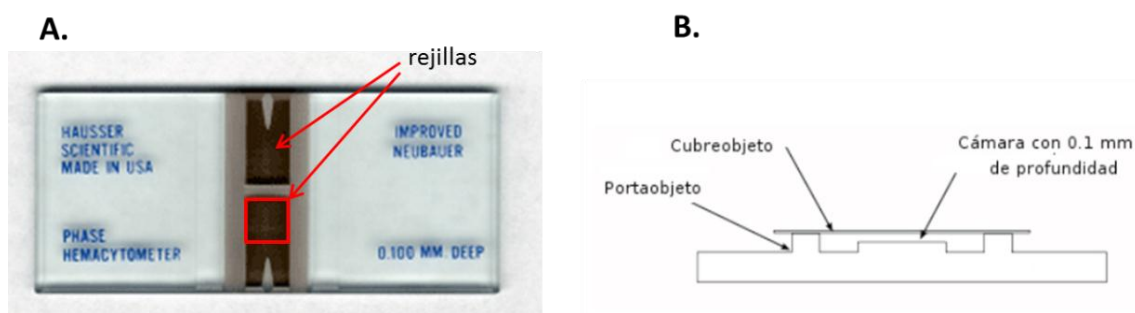
**Figura 16. Esquema resumen del procesamiento de las muestras de lavado nasal.** PBS: tampón fosfato salino. EDTA2%-PBS: EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) al 2% en PBS. RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. RPM: revoluciones por minuto. ml: mililitros. µl: microlitros.

#### 4.4.1.2.2. Conteo y descripción de leucocitos en muestras respiratorias

Para ello es necesario el procesamiento de la muestra según lo indicado en la **figura 16**, durante el cual se realizan dos pasos importantes:

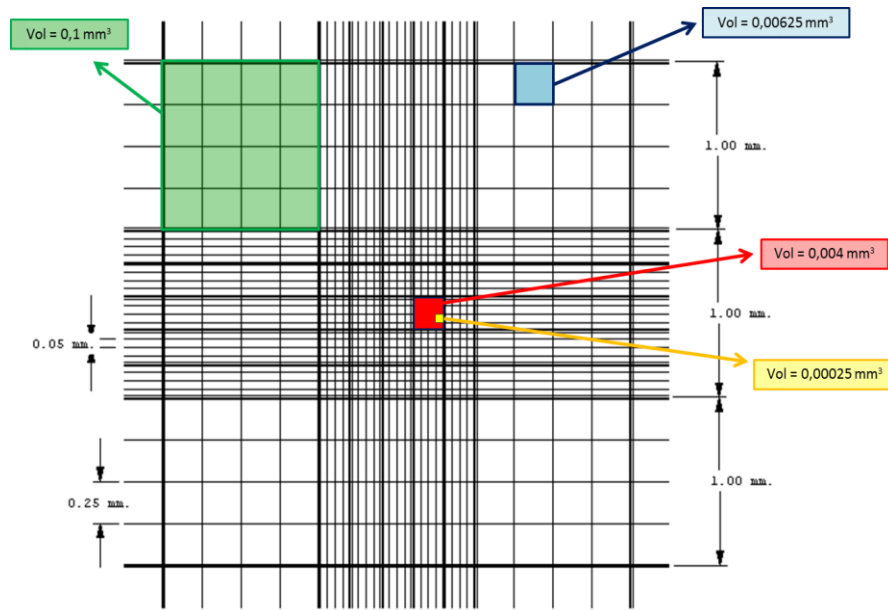
##### 4.4.1.2.2.1. Utilización del hemocitómetro

El hemocitómetro consta de un portaobjetos especializado en el cual se ha grabado una retícula con láser y sobre el que se coloca un cubreobjetos de cristal (**Fig. 17**). La rejilla se encuentra compuesta por nueve cuadros de  $1\text{ mm}^2$  cada uno (**Fig. 18**), y se encuentra a una profundidad de  $0,1\text{ mm}$  por debajo del cubreobjetos, limitando un volumen determinado de  $0,1\text{ mm}^3$  por cada uno de los 9 cuadros de la rejilla. Cada portaobjetos contiene dos rejillas. Después de cargarse con la muestra, el hemocitómetro se coloca bajo el microscopio y se contabilizan las células presentes en cada cuadro, lo que permite calcular la concentración de leucocitos en la muestra estudiada.



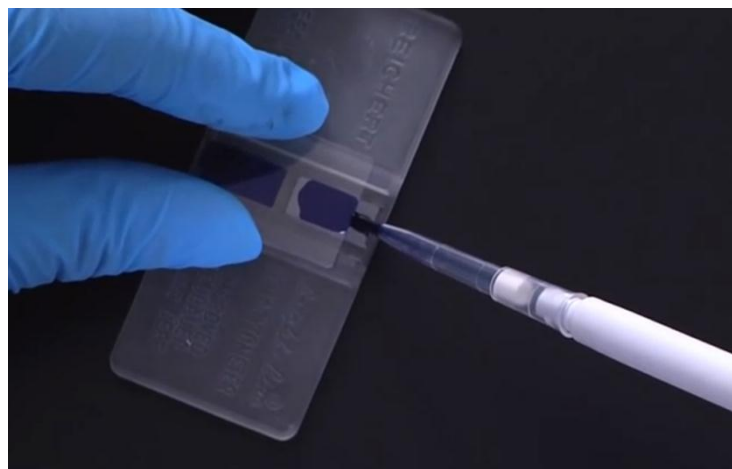
**Figura 17. A) Hemocitómetro. B) Esquema del porta y cubreobjetos.** Adaptado de: [http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell\\_counts\\_SPA.pdf](http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf)





**Figura 18. Esquema descriptivo de la retícula grabada de un hemocitómetro.** Cada cuadro coloreado equivale al volumen (Vol) indicado. Adaptado de: [http://www.hausserscientific.com/products/hausser\\_bright\\_line.html](http://www.hausserscientific.com/products/hausser_bright_line.html)

El test de exclusión de colorante azul tripán es un procedimiento para contar células viables a través de la tinción de las mismas. Este método se basa en el hecho de que las células vivas no incorporan el tinte, mientras que las muertas se tiñen. Para realizar el test, se toma un pequeño volumen de la suspensión celular (10  $\mu$ l) y se diluye en un volumen determinado de azul tripán  $\pm$  tampón fosfato salino (PBS), que será mayor conforme mayor sea la concentración celular (diluciones 1/1, 1/10 o 1/20). De la dilución final se toman 10  $\mu$ l y se carga la cámara del hemocitómetro (**Fig. 19**).



**Figura 19. Carga del hemocitómetro con la dilución células-azul tripán**

Cada cuadrado del hemocitómetro representa un volumen total de 0,1 mm<sup>3</sup>, por lo tanto la concentración celular por ml se calcula como:

$$\text{Concentración (cél/ml)} = \text{promedio de células vivas/cuadrado} \times \text{factor de dilución} \times 10^4$$

Donde el factor de dilución se calcula:

$$\frac{\text{Volumen final [vol. céls + (vol. azul tripán ± vol. PBS)]}}{\text{Volumen de células}}$$

(Ej: si se toman 10 µl de suspensión celular y se diluyen con 10 µl de azul tripán, el volumen final son 20 µl → 20 µl/10 µl = factor de dilución de 2).

#### **4.4.1.2.2. Contabilización y tinción**

Tras contabilizar 50.000 células de cada muestra con el hemocitómetro, se diluyen hasta un volumen de 200 µl y se procesan inmediatamente en la citocentrifugadora Thermo Scientific™ Cytospin™ 4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) durante 5 minutos a 1.000 RPM. La citocentrifugación da lugar a un portaobjetos con una preparación de células en una sola capa, la cual se identifica con el código del sujeto de estudio y se envía al laboratorio de Anatomía Patológica, donde se realiza una tinción de Wright-Giemsa para identificar los leucocitos y la proporción de cada tipo de célula (neutrófilos, linfocitos, monocitos/macrófagos y eosinófilos) en la muestra.

#### **4.4.1.2.3. Identificación y cuantificación del VRS por PCR en tiempo real**

Para la cuantificación de la carga viral se realizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en un solo paso, RT-PCR (Qiagen Quantitect) dirigida a la región conservada del gen N del VRS. Se utilizó el secuenciador ABI-7000 (Applied Biosystems) con 5 µl de ADN complementario en un volumen total de 50 µl de



mezcla maestra, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.<sup>41,286</sup> Para obtener una curva estándar se utilizaron concentraciones conocidas de VRS A y B. Los controles negativos y positivos se sometieron a análisis al mismo tiempo que se analizaba cada una de las muestras de los sujetos a estudio. La secuenciación se efectuó de la siguiente manera: los cebadores de VRS A sentido (5'-AGA TCA ACT TCT GTC ATC CAG CAA) y antisentido (5'-TTC TGC ACA TCA TAA TTA GGA GTA TCA EN cebadores) amplificaron una región de 85 pares de bases que contenía la sonda de 25-mer marcada con FAM (5'-CAC CAT CCA ACG GAG CAC AGG AGA T). De igual manera, los cebadores de VRS B sentido (5'-AAG ATG AAC ATC ATA AAT TCA CAG GA) y antisentido (5'-TGA TAT CCA GCA TCT TTA AGT ATC TTT ATA GTG) también se amplificaron utilizando la sonda de 25-mer marcada con FAM (5'-AGG TAT GTT ATA TGC TAT GTC CAG GTT AGG AAG GGA A).

#### 4.4.2. Muestras de sangre: análisis de citoquinas en plasma

En todos los participantes del estudio se intentó obtener una muestra de sangre periférica para la determinación del hemograma con diferencial. Además, en un subgrupo de sujetos fue posible extraer una muestra de sangre periférica extra para realizar análisis de citoquinas. La sangre (0,5-1 ml) se recogió en tubos heparinizados (Vacutainer™, BD, Franklin Lakes, NJ), se mantuvo en frío, en hielo común, y posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 3.000 RPM en la primera hora tras la recogida para la separación del plasma. Después se almacenó el plasma de dichas muestras a -80 °C para la posterior determinación de la concentración de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, utilizando el quimioluminómetro automatizado Immulite® (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA).<sup>100,287</sup> El límite de detección del ensayo fue de 5 pg/ml para TNF- $\alpha$  e IL-8 y 2 pg/ml para IL-6, y todas las muestras se realizaron en duplicado.

#### **4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las características basales y demográficas de los sujetos se presentan mediante estadística descriptiva. El análisis descriptivo de las variables cualitativas se estableció mediante frecuencias absolutas y porcentajes. La asunción de la normalidad para las variables continuas se comprobó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En el caso de variables cuantitativas que siguen una distribución normal, el análisis descriptivo se realizó mediante el cálculo de la media y la desviación estándar. Si las variables no seguían una distribución normal se utilizaron la mediana y el rango intercuartílico (percentil 25-percentil 75).

La comparación entre variables cualitativas se determinó mediante el test de Chi-cuadrado o el Chi-cuadrado corregido por Yates para frecuencias esperadas menores de 5. Para la comparación de dos grupos de variables cuantitativas con distribución normal se utilizó la prueba T de Student y en el caso de rechazo de la hipótesis de normalidad el test U de Mann-Whitney. En el caso de comparaciones múltiples de variables continuas, se realizó el test de análisis de la varianza (ANOVA) o el test de Kruskal-Wallis ajustado por múltiples comparaciones (Dunn's o Dunnett test), según la distribución de los datos. Para la estimación del riesgo se empleó la odds ratio (OR) con intervalos de confianza del 95%. En todas las pruebas se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$  de forma bilateral.

Los datos de cada participante se introdujeron en una base de datos Excel (Microsoft Office 2010®). El análisis de los datos se realizó mediante los programas estadísticos SigmaPlot 11.0 (Systas Software, Inc.) o SAS software, versión 9.2. Para la creación de gráficos se utilizó GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) y Power Point 2010 (Microsoft Office 2010®).

## **CAPÍTULO 5. RESULTADOS**

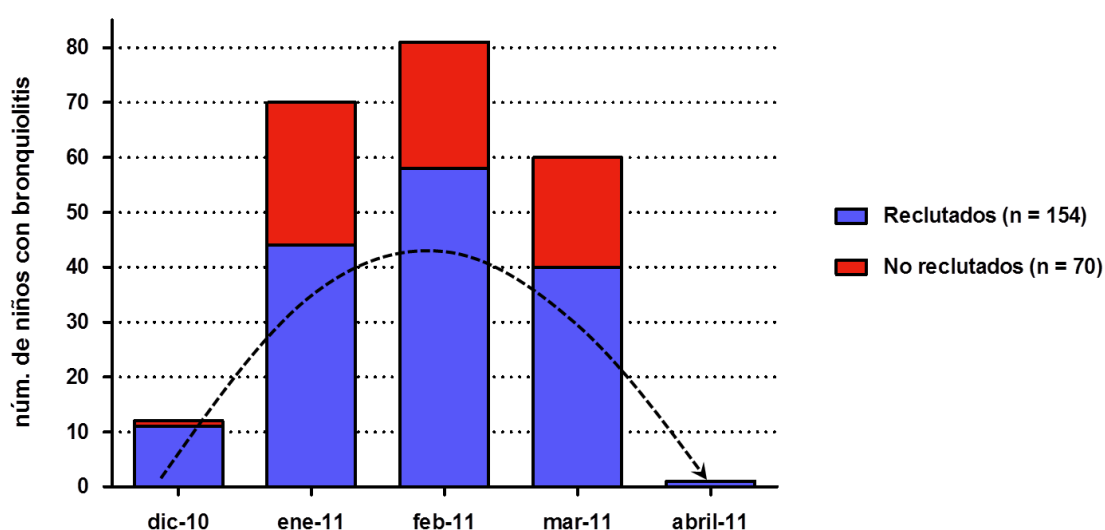


UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## 5.1. SUJETOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

### 5.1.1. Sujetos reclutados y excluidos

Desde diciembre de 2010 hasta julio de 2011 se reclutaron 154 niños con bronquiolitis, además de 23 controles sanos. Con este fin se visitaron 224 pacientes, objetivándose una proporción de éxito de reclutamiento del 70% (**Fig. 20**). Los pacientes con infección por VRS fueron incluidos de diciembre a abril, y los controles sanos desde el principio de marzo a julio, el 70% de ellos mientras había aún actividad por el VRS.

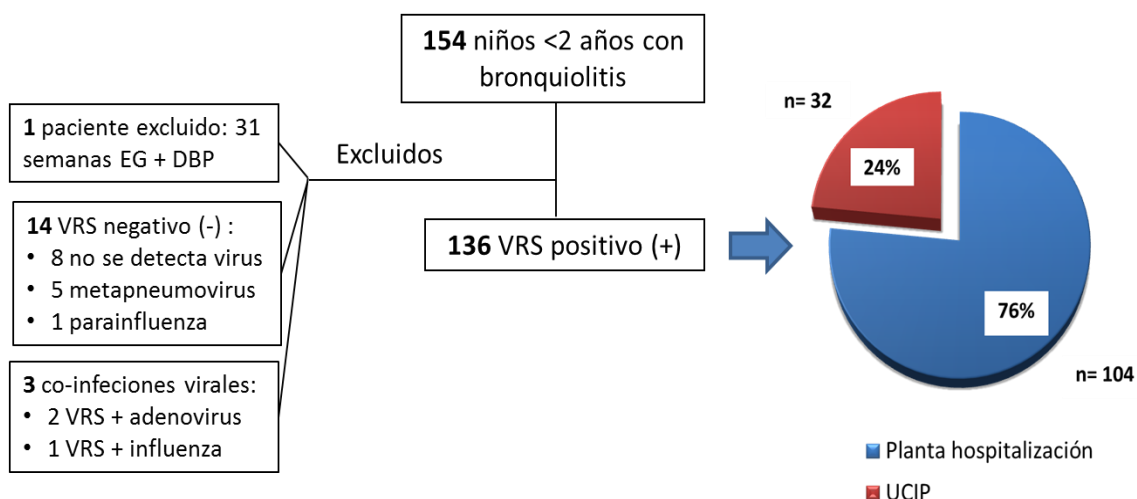


**Figura 20. Pacientes visitados: proporción de reclutamiento**

De los 154 pacientes reclutados, 18 se excluyeron por los siguientes motivos:

- Un paciente fue excluido por presentar historia de prematuridad (31 semanas de edad gestacional) y displasia broncopulmonar.
- Catorce pacientes por manifestar una ITRI de etiología diferente al VRS (5 infecciones por metapneumovirus humano y 1 por el virus parainfluenza) o desconocida (8 pacientes con test de diagnóstico viral al ingreso y RT-PCR negativos).
- Tres pacientes se excluyeron por presentar coinfección por VRS y otro virus (2 coinfecciones por VRS-adenovirus y 1 por VRS-influenza).

Finalmente, sólo se incluyeron en el estudio 136 niños menores de 2 años con ITRI por VRS, de los cuales 104 niños fueron reclutados en la planta de hospitalización y 32 en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP) con una mediana de 24 (24-72) horas desde el ingreso (**Fig. 21**).



**Figura 21. Pacientes reclutados y pacientes incluidos finalmente en el estudio**

En el 96% de los pacientes se había realizado de rutina al ingreso alguna de las pruebas de diagnóstico viral establecidas en el hospital para identificar la infección por VRS (58% mediante IFD, 36% mediante test antigénico rápido para VRS y 2% gracias a un panel de PCR viral). En 5 niños (4%) no se realizó ninguna de estas pruebas diagnósticas y fueron igualmente reclutados con una alta sospecha de infección por VRS. El VRS se confirmó posteriormente en las muestras respiratorias de todos estos pacientes (y se descartó en muestras de controles sanos) gracias a la realización de una qRT-PCR para VRS en el laboratorio del Centro de Vacunas e Inmunología.

## 5.2. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA

### 5.2.1. Niños con bronquiolitis por VRS y controles sanos

#### 5.2.1.1. Características demográficas

El 62% (n= 84) de los pacientes fueron varones, con una mediana de edad de 2,5 (1,5-4,4) meses. Al comparar las características demográficas y basales de los pacientes y los controles sanos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, excepto que en el grupo de controles sanos hubo más niños de raza negra incluidos (**Tabla 2**).

	Controles (n=23)	Pacientes VRS (n=136)	Valor de p
<b>Edad (meses)</b>	3,2 [1,6-8,2]	2,5 [1,5-4,4]	0,136
<b>Sexo [n (%)]</b>			
Varón	15 (65)	84 (62)	0,819
Mujer	8 (35)	52 (38)	
<b>Edad Gestacional (semanas)</b>	39 [38-40]	40 [38-40]	0,514
<b>Raza [n (%)]</b>			
Blanca	10 (43,5)	98 (72)	0,007
Negra	10 (43,5)	21 (15)	
Otros	3 (13)	17 (13)	
<b>Lactancia materna*</b>	5/20 (25)	36/133 (27)	0,845
<b>Estado vacunal [n (%)]</b>			
Completo	20 (87)	115 (85)	0,482
Incompleto	1 (4)	14 (10)	
Desconocido	2 (9)	7 (5)	
<b>Tabaquismo pasivo*</b>	6/15 (40)	49/100 (49)	0,582
<b>Asistencia a guardería o hermanos en edad escolar*</b>	11/17 (65)	107/132 (81)	0,124

**Tabla 2. Características demográficas en niños con infección por VRS y controles sanos.** Los datos se expresan como medianas y [rango intercuartílico 25%-75%]. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de sujetos en cada grupo. Se utilizó el test de Mann-Whitney para variables continuas y el de Chi-cuadrado para el análisis de datos categóricos. \*En las variables lactancia materna, tabaquismo pasivo y asistencia a guardería o exposición a hermanos en edad escolar, el número de sujetos en los cuales se documentó ese parámetro se incluye en el denominador, y los porcentajes han sido calculados en base a dicho denominador.

Del total de los niños hospitalizados con bronquiolitis por VRS, 76% (104/136) fueron ingresados en la planta de hospitalización y 24% (32/136) en la UCIP. Las características demográficas de estos grupos de pacientes fueron parecidas en relación a la edad, sexo raza y otros factores epidemiológicos reflejados en la cohorte general (**Tabla 2**). Tal y como era de esperar, los parámetros clínicos de gravedad en los pacientes ingresados en la UCIP fueron significativamente diferentes en comparación con los lactantes hospitalizados en la planta de pediatría. En estos pacientes se objetivó una mayor necesidad y duración de oxígeno suplementario, mayor duración de la hospitalización, menor saturación de O<sub>2</sub> basal al ingreso y mayor score clínico de gravedad (CDSS) al ingreso. En todos los niños ingresados en la UCIP se solicitó una radiografía de tórax al ingreso, en comparación con el 78% de los que fueron ingresados en la planta de hospitalización ( $p=0,008$ ). Además, en los pacientes que precisaron UCIP la presencia de atelectasias y consolidación lobar fue significativamente más frecuente que en los pacientes ingresados en la planta de pediatría ( $p=0,014$ ). Seis de los pacientes que precisaron ingreso en UCIP fueron intubados.

#### 5.2.1.2. Parámetros de laboratorio

También se compararon los datos del hemograma realizados en el momento de reclutamiento en el estudio ( $\pm 24$  horas del ingreso), y tanto el número total de leucocitos como su recuento diferencial en sangre periférica fueron significativamente diferentes entre los lactantes con bronquiolitis y los controles sanos. Con respecto a las muestras de lavado nasofaríngeo, se observó que el número total de leucocitos era similar entre los grupos, pero el porcentaje de neutrófilos fue significativamente mayor en los pacientes con infección por VRS (**Tabla 3**).



	Controles (n=23)	Pacientes VRS (n=136)	Valor de p
<b>Sangre periférica</b>			
Hemograma ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	7,8 [7,4-9,4]	11,3 [8,8-13,4]	0,004
Neutrófilos %	17,0 [12,0-22,0]	27,0 [17,0-35,0]	0,023
Linfocitos %	73,0 [62,0-77,0]	52,5 [42,5-62,0]	<0,001
Monocitos %	9,0 [5,0-11,0]	11,0 [8,0-15,5]	0,046
Eosinófilos %	3,0 [2,0-4,0]	0,0 [0,0-1,5]	<0,001
<b>Lavado nasofaríngeo</b>			
Leucocitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) (log10)	6,0 [5,9-6,1]	5,8 [5,2-6,1]	0,646
Neutrófilos %	78 [49-95,7]	97 [93-98]	0,008

**Tabla 3. Parámetros de laboratorio en sangre periférica y muestras respiratorias en niños con infección por VRS y controles sanos.** Para el análisis se utilizó el test de Mann-Whitney y los datos se expresan como medianas y [rango intercuartílico 25%-75%]. Hemograma: leucocitos totales en el hemograma de sangre periférica.

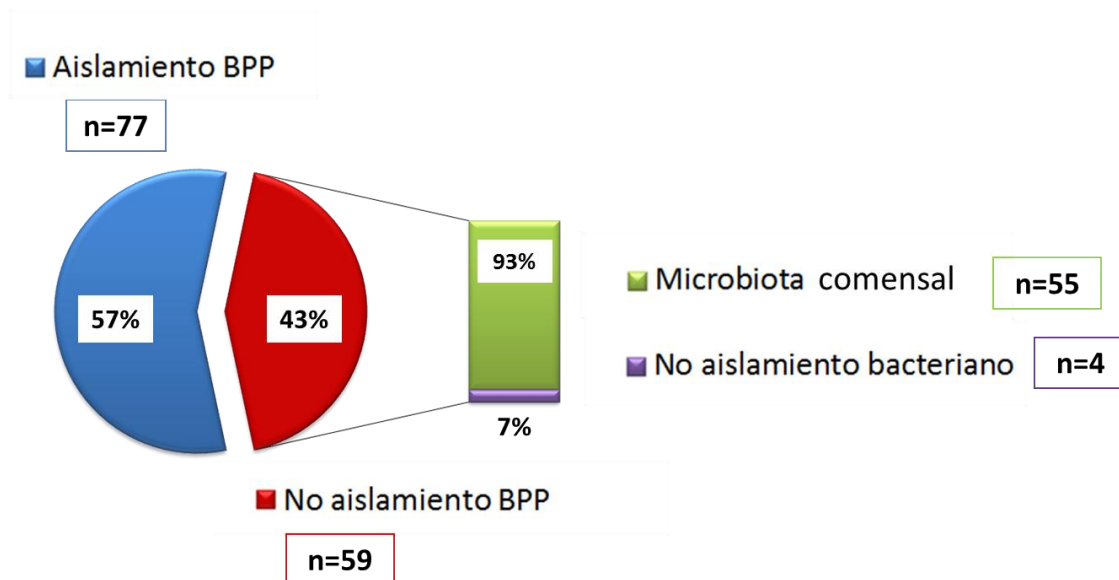
### 5.3. TRATAMIENTO CON ANTIBIÓTICOS Y COLONIZACIÓN NASOFARÍNGEA

#### 5.3.1. Tasas de colonización nasofaríngea y especies bacterianas

En general, el 57% (77/136) de los niños ingresados con ITRI por VRS estaban colonizados por al menos una de las siguientes bacterias potencialmente patógenas (BPP): *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* del grupo B o *Streptococcus* del grupo A. Todos los *Haemophilus influenzae* aislados correspondían a cepas no tipificables y no se aisló ninguna *Neisseria meningitidis*.

En los niños en los que no se aisló ningún potencial patógeno respiratorio bacteriano (59/136; 43%), se aislaron en el 93% (55/59) bacterias pertenecientes a la microbiota comensal de la nasofaringe, como *Streptococcus* del grupo viridans,

*Streptococcus* no hemolíticos (no *S. pneumoniae*), *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Neisseria* sp. (no *gonorrhoeae* ni *meningitidis*), *Corynebacterium* sp., *H. parainfluenzae*, *Rothia* (*Stomacoccus* sp.) y *Enterococcus* spp.; en el 7% restante (4/59) no se detectó crecimiento bacteriano (**Fig. 22**).



**Total = 136 pacientes con bronquiolitis VRS (+)**

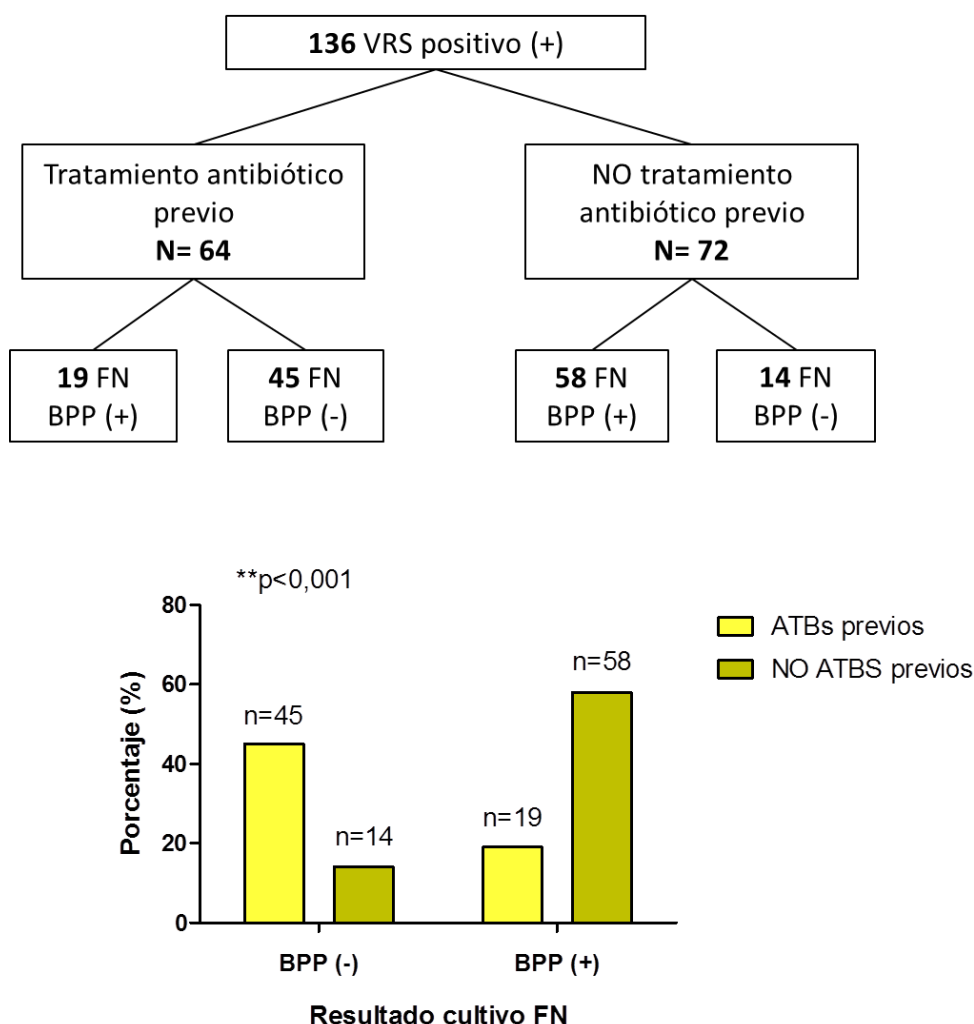
**Figura 22.** Resultados de los frotis nasofaríngeos en el total de pacientes (n=136). BPP: bacterias potencialmente patógenas.

### 5.3.2. Efecto general de los antibióticos sobre la colonización nasofaríngea

Con respecto al uso de antibióticos, el 47% (64/136) de los pacientes recibió al menos una dosis de antibióticos antes de su inclusión en el estudio. En concreto, la administración de antibióticos fue significativamente mayor en pacientes ingresados en la UCIP, donde se documentó el uso de antibióticos en el 75% (24/32) de los niños, en comparación con el 38,5% (40/104) de los ingresados en la planta ( $p=0,008$ ). En general, los antibióticos más utilizados fueron los betalactámicos (56/64; 87,5%), seguidos de la vancomicina (25/64; 39%), macrólidos (22/64; 34,3%) y los aminoglucósidos (11/64; 17,2%). Además, en todos los niños ingresados en la UCIP que recibieron antibióticos se utilizó tratamiento combinado con al menos 2 antibióticos, siendo esta proporción del 22,5% en los niños ingresados en la planta ( $p<0,001$ ). Las

combinaciones más frecuentes de antibióticos fueron betalactámico-vancomicina-macrólido (10/64, 16%) y betalactámico-vancomicina (9/64; 14%).

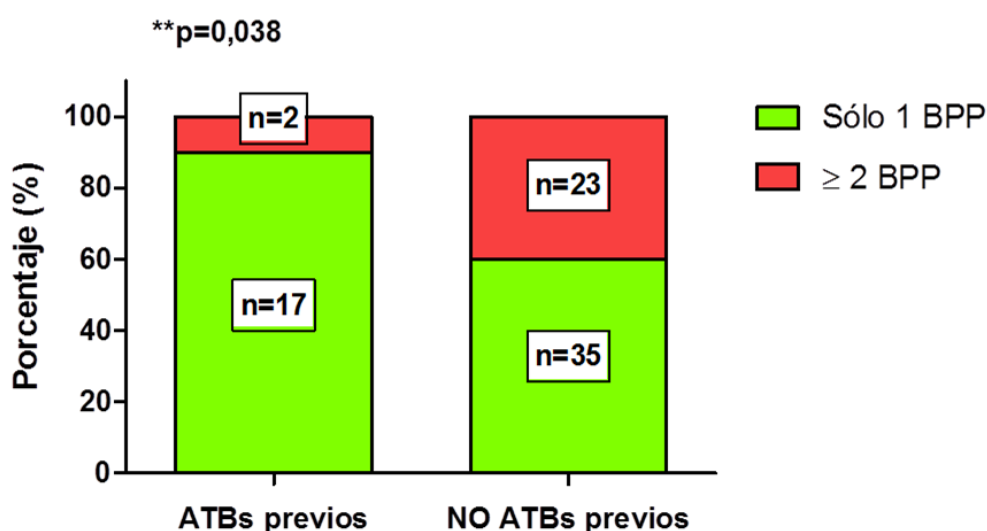
Observamos que hasta el 76% (45/59) de los niños en los que no se aisló ninguna bacteria potencialmente patógena en la nasofaringe habían recibido tratamiento antibiótico antes de la recogida de las muestras nasofaríngeas, siendo estas proporciones mucho mayores en la UCIP (20/22; 91%) que en la planta de hospitalización (25/37; 67,5%). Además, sólo se aislaron bacterias potencialmente patógenas en el 30% (19/64) de los niños que recibieron tratamiento antibiótico, en comparación con hasta el 81% (58/72) de los que no lo recibieron ( $p<0,001$ ; **Fig. 23**).



**Figura 23. Resultado de los frotis nasofaríngeos según la administración o no de antibióticos antes de la recogida de las muestras.**

FN: frotis nasofaríngeo; BPP: bacterias potencialmente patógenas; ATBs: antibióticos; para el análisis se utilizó el test de Chi-cuadrado.

De hecho, observamos que el aislamiento bacteriano disminuyó significativamente tanto de forma aislada como en combinación con otras bacterias potencialmente patógenas con el uso de antibióticos: la administración de antibióticos se asoció con una probabilidad 10 veces menor de aislar bacterias potencialmente patógenas (OR intervalo de confianza del 95%: 9,8 [4,4-21,6];  $p < 0,001$ ); **Figs. 23 y 24.**



**Figura 24. Colonización nasofaríngea única o múltiple según la administración o no de antibióticos antes de la recogida de las muestras.** BPP: bacterias potencialmente patógenas. ATBs: antibióticos. Para el análisis se utilizó el test de Chi-cuadrado.

### 5.3.3. Efecto de los antibióticos sobre la densidad bacteriana

Con respecto a la densidad bacteriana, también se observó que la administración de antibióticos se asoció a una probabilidad 3,4 veces mayor de aislar escasas o pocas unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias potencialmente patógenas en los cultivos, en detrimento de los aislamientos moderados o abundantes (OR intervalo de confianza del 95%: 3,4 [1,1-10,4];  $p = 0,049$ ).

### 5.3.4. Características demográficas, clínicas y de laboratorio de los niños tratados o no con antibióticos

A la luz de estos hallazgos y para determinar si el grupo de pacientes que recibió antibióticos representaba un fenotipo diferente y se asociaba a una mayor gravedad por VRS, comparamos los parámetros demográficos, de laboratorio y de gravedad clínica entre los niños tratados o no con antibióticos. Las características demográficas y clínicas fueron comparables entre ambos grupos, incluyendo la presencia y duración de la fiebre, la necesidad de oxígeno suplementario, la duración de la hospitalización y la puntuación del score clínico de gravedad. Sin embargo, en los pacientes que recibieron antibióticos se realizó hemograma con más frecuencia, precisaron oxígeno durante más tiempo y presentaban consolidación lobar en base a la radiografía de tórax con más frecuencia que los niños no tratados con antibióticos (Tablas 4 y 5).

	Pacientes tratados con antibióticos (n=64)	Pacientes no tratados con antibióticos (n=72)	Valor de p
<b>Características demográficas</b>			
<b>Edad (meses)</b>	2,6 [1,5-5,1]	2,4 [1,5-4]	0,628
<b>Sexo [n (%)]</b>			0,852
Varón	39 (61)	45 (62,5)	
Mujer	25 (39)	27 (37,5)	
<b>Raza [n (%)]</b>			0,077
Blanca	52 (81)	46 (64)	
Negra	7 (11)	14 (19)	
Otros	5 (8)	12 (17)	
<b>Parámetros de laboratorio</b>			
<b>Realización hemograma [n (%)]</b>	54 (84,3)	43 (59,7)	0,002
<b>Hemograma (<math>\times 10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	11,2 [9,1-14,6]	11,3 [7,9-12,8]	0,452
<b>Neutrófilos %</b>	28,5 [16,0-39,0]	24,0 [17,0-31,0]	0,195
<b>Linfocitos %</b>	47,8 $\pm$ 16,3	58,1 $\pm$ 12,9	0,001
<b>Monocitos %</b>	12,0 $\pm$ 5,6	10,9 $\pm$ 4,8	0,287

**Tabla 4. Características demográficas y parámetros de laboratorio en niños con bronquiolitis VRS tratados con y sin antibióticos antes de la recogida de las muestras.** Se utilizó el test de Mann-Whitney o t-Student para variables continuas y el de Chi-cuadrado para el análisis de datos categóricos. Los datos se expresan como medianas [rango intercuartílico 25%-75%] o medias  $\pm$  desviación típica. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de sujetos en cada grupo. Hemograma: leucocitos totales en el hemograma de sangre periférica.

	Pacientes tratados con antibióticos (n=64)	Pacientes no tratados con antibióticos (n=72)	Valor de p
<b>Determinantes de gravedad</b>			
<b>Fiebre</b>			
Presencia [n (%)]	49 (76,5)	45 (62,5)	0,113
Duración (días)	2 [1-4]	2 [1-3,5]	0,288
<b>Oxígeno:</b>			
Necesidad [n (%)]	48 (75)	56 (78)	0,703
Duración (días)	2,2 [1-4]	1,5 [0,7-2,5]	0,016
<b>CDSS</b>	5 [3-12]	5 [3-7]	0,340
<b>Duración hospitalización (días)</b>	3 [2-5]	2 [2-3]	0,272
<b>Características radiológicas</b>			
<b>Realización Rx tórax [n (%)]</b>	55 (86)	58 (80,5)	0,403
<b>Patrón radiológico [n (%)]</b>			
Normal	4 (7)	3 (5)	0,013
EPB o hiperinsuflación	17 (31)	32 (55)	
Atelectasia o II	18 (33)	18 (31)	
Consolidación lobar	16 (29)	5 (9)	

**Tabla 5. Determinantes de gravedad de la enfermedad y características radiológicas en niños con bronquiolitis VRS tratados con y sin antibióticos antes de la recogida de las muestras.** CDSS: Clinical Disease Severity Score (Score Clínico de Gravedad). Rx: radiografía. EPB: engrosamiento peribronquial. II: infiltrados intersticiales. Para el análisis se utilizó el test de Mann-Whitney para variables continuas y el de Chi-cuadrado para el análisis de datos categóricos. Los datos se expresan como medianas [rango intercuartílico 25%-75%]. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de sujetos en cada grupo.

La realización de cultivos de sangre y de orina fue significativamente mayor en los niños que recibieron antibióticos en comparación con los que no recibieron antibióticos (66% vs. 33%,  $p < 0,001$  y 44% vs. 17%,  $p = 0,046$ ; respectivamente). Todos los cultivos, en ambos grupos, fueron estériles tras 5 días de incubación.

#### 5.4. COLONIZACIÓN NASOFARÍNGEA Y EVOLUCIÓN CLÍNICA EN NIÑOS CON BRONQUIOLITIS POR VRS NO TRATADOS CON ANTIBIÓTICOS

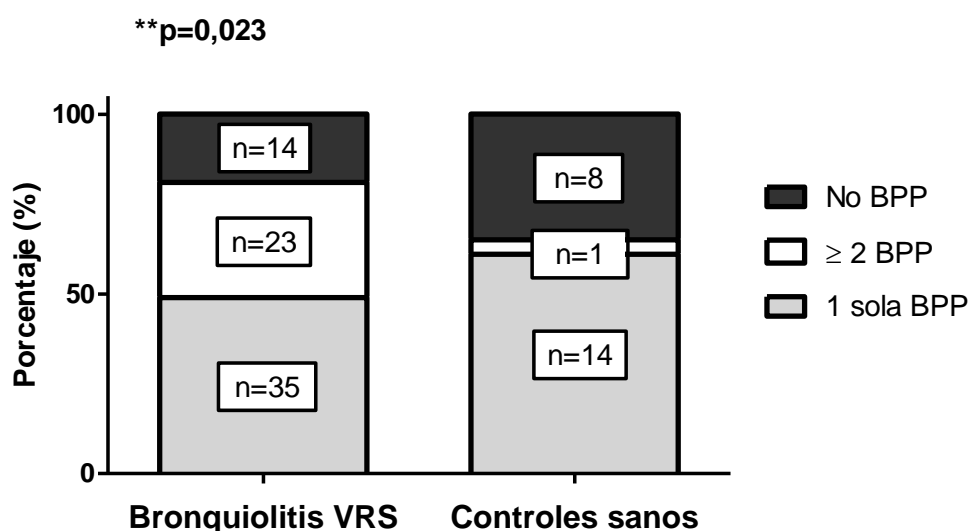
Tras observar que la administración de antibióticos limitaba nuestra capacidad para aislar bacterias potencialmente patógenas, así como el número y la densidad bacteriana de éstas, decidimos estudiar si la frecuencia de colonización y el tipo de bacterias potencialmente patógenas diferían entre los pacientes con infección por VRS y los controles sanos. Para este análisis sólo se incluyó el grupo de niños con bronquiolitis que no habían recibido antibióticos previamente a la toma de muestras (n=72). Las características demográficas fueron comparables entre los niños con infección por VRS que no había recibido antibióticos y los controles sanos (**Tabla 6**).

	Controles (n=23)	Pacientes VRS sin ATBs (n=72)	Valor de p
<b>Edad (meses)</b>	3,2 [1,6-8,2]	2,4 [1,5-4]	0,099
<b>Sexo [n (%)]</b>			
Varón	15 (65)	45 (62,5)	0,990
Mujer	8 (35)	27 (37,5)	
<b>Edad Gestacional (semanas)</b>	39 [38-40]	40 [38-40]	0,631
<b>Raza [n (%)]</b>			
Blanca	10 (43,5)	46 (64)	0,068
Negra	10 (43,5)	14 (19)	
Otros	3 (13)	12 (17)	
<b>Lactancia materna*</b>	5/20 (25)	21/70 (30)	0,877
<b>Estado vacunal [n (%)]</b>			
Completo	20 (87)	59 (82)	0,799
Incompleto	1 (4)	6 (8)	
Desconocido	2 (9)	7 (10)	
<b>Tabaquismo pasivo*</b>	6/15 (40)	28/54 (52)	0,603
<b>Asistencia a guardería o hermanos en edad escolar*</b>	11/17 (65)	53/66 (80)	0,201

**Tabla 6. Características demográficas de los niños con bronquiolitis por VRS que no habían recibido antibióticos previos y de los controles sanos.** Los datos se expresan como medianas [rango intercuartílico 25%-75%]. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de sujetos en cada grupo. Se utilizó el test de Mann-Whitney para variables continuas y el de Chi-cuadrado para el análisis de datos categóricos. \*En las variables lactancia materna, tabaquismo pasivo y asistencia a guardería o hermanos en edad escolar, el número de sujetos en los cuales se documentó ese parámetro se incluye en el denominador, y los porcentajes han sido calculados en base a dicho denominador.

#### 5.4.1. Características microbiológicas en niños con bronquiolitis por VRS y controles sanos

La proporción de colonización nasofaríngea por al menos una bacteria potencialmente patógena (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* no tipificable, *M. catarrhalis*, *S. aureus*, *Streptococcus* del grupo B o *S. pyogenes*) en niños con bronquiolitis por VRS fue de 81% (58/72), en comparación con 65% (15/23) en los controles sanos. Además, la colonización múltiple (dos o más bacterias) fue más frecuente en el grupo de niños con bronquiolitis por VRS que en los niños sanos (32% vs. 4%;  $p=0,023$ ) (Fig. 25).



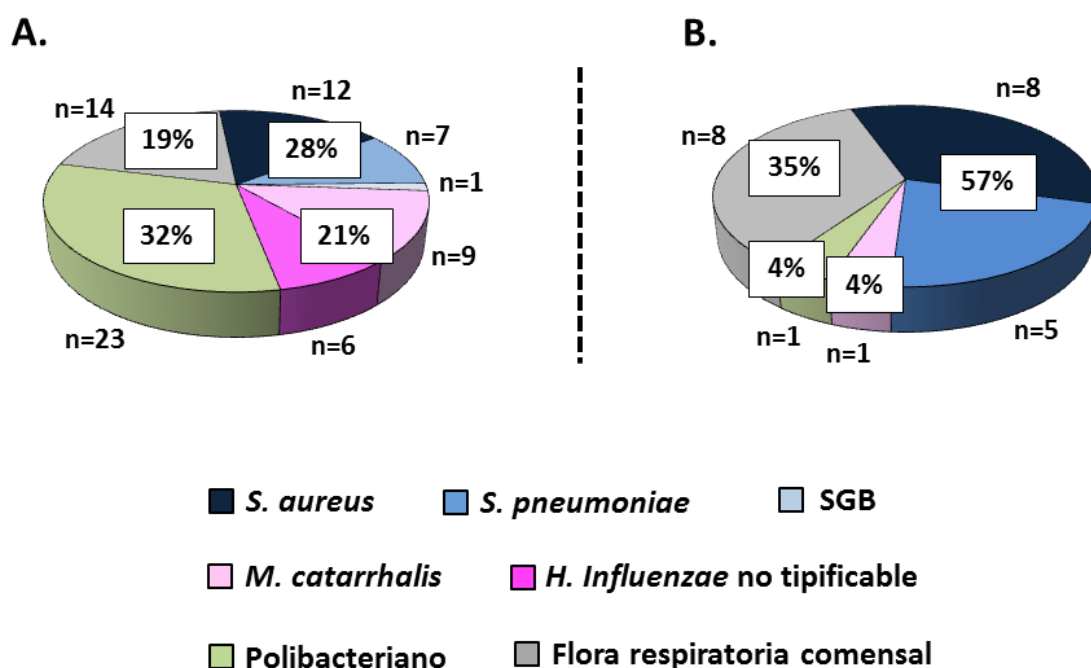
**Figura 25. Tasas de colonización nasofaríngea en niños hospitalizados por bronquiolitis por VRS y controles sanos.** BPP: bacterias potencialmente patógenas. En el eje de abscisas (X) se representan el grupo de niños con bronquiolitis por VRS que no recibieron antibióticos y el grupo de controles sanos. El eje de ordenadas (Y) muestra el porcentaje de bacterias respiratorias identificadas: 1 sola bacteria potencialmente patógena (1 sola BPP, gris claro); 2 o más bacterias potencialmente patógenas ( $\geq 2$  BPP, blanco) y no identificación de bacterias potencialmente patógenas (No BPP, gris oscuro). Las bacterias que se identificaron en el grupo denominado “No BPP” correspondían todas a bacterias de la microbiota comensal del tracto respiratorio superior. Para el análisis se utilizó el test de Chi-cuadrado.

En números absolutos, la bacteria potencialmente patógena cultivada más frecuentemente de forma aislada tanto en pacientes con VRS como en controles sanos fue el *S. aureus*. Sin embargo, proporcionalmente, las bacterias gram-positivas se cultivaron con más frecuencia en los controles sanos y las gram-negativas en los

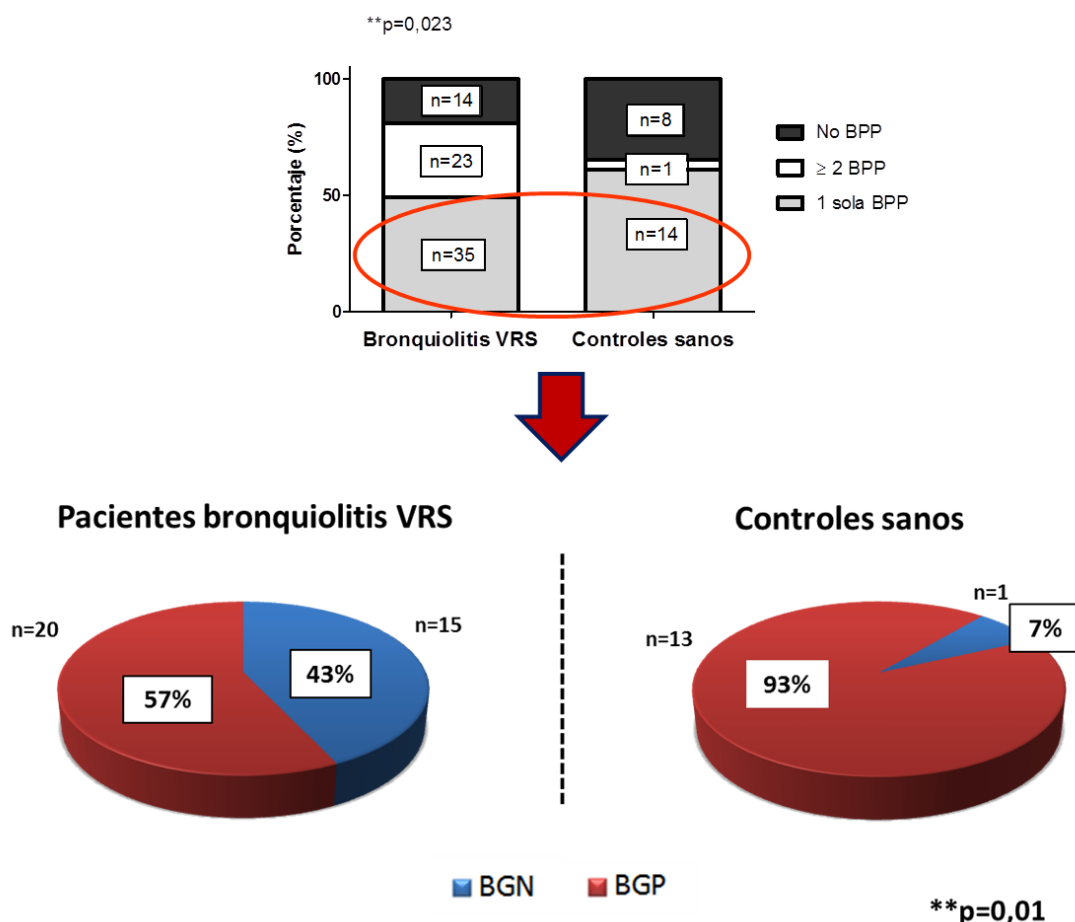


pacientes con VRS ( $p=0,01$ ). *M. catarrhalis* y *H. influenzae* se agrupan en este trabajo bajo la denominación de “bacterias gram-negativas”, mientras que *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *Streptococcus* del grupo B están agrupadas bajo la denominación de “bacterias gram-positivas” (Figs. 26 y 27).

En los pacientes con VRS, tras la colonización por *S. aureus*, las bacterias cultivadas con más frecuencia fueron *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* no tipificable, mientras que en los controles sanos fueron *S. aureus* y *S. pneumoniae* (Figs. 26 y 27). En pacientes con VRS, *Streptococcus* del grupo B se identificó en dos ocasiones, una vez de forma aislada, como único potencial patógeno, y otra en combinación con *S. aureus* y *S. pneumoniae*. *Streptococcus pyogenes* sólo se cultivó en una muestra nasofaríngea, en combinación con *S. aureus* y *M. catarrhalis*, también en un lactante con VRS. En los controles sanos no se aisló ningún *Streptococcus* del grupo B o *S. pyogenes*.



**Figura 26. Tipo y porcentaje de bacterias colonizadoras de la nasofaringe en niños hospitalizados por bronquiolitis por VRS y controles sanos.** SGB: *Streptococcus* del grupo B. Los gráficos circulares representan el porcentaje de bacterias potencialmente patógenas gram-negativas (*M. catarrhalis* y *H. influenzae* no tipificable), gram-positivas (*S. aureus*, *S. pneumoniae* y *Streptococcus* del grupo B), así como el porcentaje de aislamientos con 2 o más bacterias potencialmente patógenas y flora respiratoria comensal en frotis nasofaríngeos de niños hospitalizados con bronquiolitis por VRS (A) y niños sanos (B).



**Figura 27. Proporción de bacterias potencialmente patógenas gram-negativas (BGN) y gram-positivas (BGP), en frotis con una sola bacteria identificada, en pacientes con bronquiolitis por VRS y controles sanos.** Para el análisis se utilizó el test exacto de Fisher.

El aislamiento de 2 o más bacterias potencialmente patógenas en el frotis nasofaríngeo se documentó en 23 pacientes con bronquiolitis por VRS y en un control sano (**Fig. 26**). En 18 pacientes se halló una doble colonización, siendo la mayoría (80%) combinaciones de una bacteria gram-negativa (*M. catarrhalis* o *H. influenzae* no tipificable) y una bacteria gram-positiva (*S. aureus* o *S. pneumoniae*): *M. catarrhalis* con *S. pneumoniae* (n=5) o *S. aureus* (n=3), seguido de *H. influenzae* no tipificable con *S. aureus* (n=5) o *S. pneumoniae* (n=2). Dos pacientes estaban colonizados por 2 bacterias gram-negativas y uno con 2 bacterias gram-positivas. En los 5 pacientes restantes, la colonización nasofaríngea fue triple, y la combinación más frecuente incluía dos bacterias gram-negativas y una gram-positiva. La única combinación identificada en los controles sanos fue *H. influenzae* no tipificable y *S. pneumoniae* (**Tabla 7**).

Combinaciones de BPP	
Niños con bronquiolitis por VRS (n=23)	
HiNT + M. cat	2 (8,7)
HiNT + SPN	2 (8,7)
SPN + SA	1 (4,3)
M. cat + SA	3 (13)
M. cat + SPN	5 (21,7)
HiNT + SA	5 (21,7)
SA + M. cat + SGA	1 (4,3)
SGB + SPN + SA	1 (4,3)
SPN + SA + M. cat	1 (4,3)
HiNT + SPN + SA	1 (4,3)
HiNT + M. cat + SPN= 9	1 (4,3)
Controles sanos (n=1)	
HiNT + SPN	

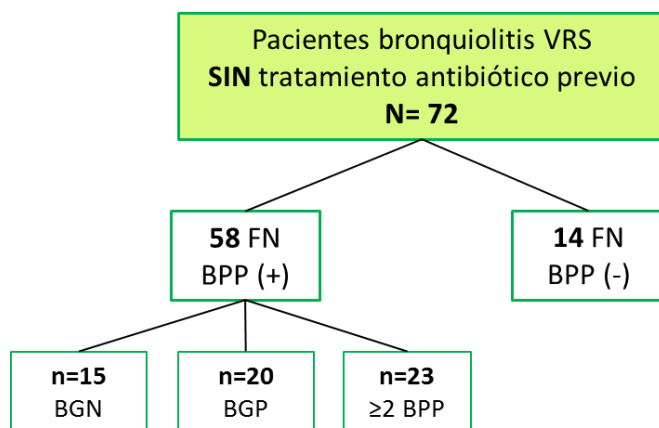
**Tabla 7. Combinaciones de bacterias potencialmente patógenas en frotis nasofaríngeos polibacterianos de niños ingresados por bronquiolitis por VRS y controles sanos.** HiNT: *Haemophilus influenzae* no tipificable; M. cat: *Moraxella catarrhalis*; SPN: *Streptococcus pneumoniae*; SA: *Staphylococcus aureus*; SGA: *Streptococcus* del grupo A; SGB: *Streptococcus* del grupo B. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de sujetos en cada grupo.

En relación a la densidad bacteriana, la mayoría de los pacientes con bronquiolitis por VRS colonizados por una sola bacteria (gram-negativa o gram-positiva) presentaron un crecimiento bacteriano identificado como moderado o abundante medido por UFC por placa (73% BGN; 75% BGP).

#### 5.4.2. Características de la bronquiolitis por VRS y evolución clínica de la enfermedad en los niños colonizados por bacterias potencialmente patógenas

Posteriormente estudiamos si el tipo de bacteria presente en la nasofaringe de los niños con bronquiolitis por VRS influía en la gravedad de la enfermedad. Como hemos comentado anteriormente, todos los análisis se realizaron en el grupo de pacientes que no había recibido antibióticos antes de la recogida de las muestras (n=72).

Para ello, se compararon los pacientes con bronquiolitis colonizados por bacterias pertenecientes a la flora respiratoria comensal con aquellos colonizados por bacterias potencialmente patógenas, y éste último grupo de pacientes lo dividimos a su vez en 3 subgrupos, dependiendo del tipo de bacteria aislado en los frotis nasofaríngeos: bacterias gram-negativas (*H. influenzae* no tipificable o *M. catarrhalis*); bacterias gram-positivas (*S. pneumoniae*, *S. aureus* o *Streptococcus* del grupo B) o polibacteriano (aislamiento de más de una bacteria) (**Fig. 28**).



**Figura 28. Tipo de bacterias identificadas en los frotis nasofaríngeos de los pacientes hospitalizados con bronquiolitis por VRS que no recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras.** FN: frotis nasofaríngeo; BPP: bacterias potencialmente patógenas; BGN: aislamiento de 1 bacteria gram-negativa; BGP: aislamiento de 1 bacteria gram-positiva; ≥2 BPP: aislamiento de 2 o más bacterias potencialmente patógenas.

## 5.4.2.1. Características demográficas

Las características epidemiológicas y demográficas de los 72 niños con infección por VRS, dependiendo de la presencia y tipo de colonización bacteriana, fueron similares, exceptuando que el grupo de pacientes colonizados por al menos una bacteria potencialmente patógena asistían con más frecuencia a la guardería o tenían contacto con hermanos en edad escolar en mayor proporción que los colonizados por flora respiratoria (**Tabla 8**).

	Flora Resp. <sup>1,2</sup> (n=14)	Al menos 1 BPP <sup>1</sup> (n=58)	BGN <sup>2</sup> (n=15)	BGP <sup>2</sup> (n=20)	≥2 PPB <sup>2</sup> (n=23)	Valor p <sup>1</sup>	Valor p <sup>2</sup>
<b>Edad (meses)</b>	1,8 [1,2-2,8]	2,8 [1,5-4,0]	3,3 [1,8-6,3]	2,2 [1,3-3,7]	2,9 [1,3-4,0]	0,137	0,179
<b>Sexo [n (%)]</b>							
Varón	9 (64)	36 (62)	9 (60)	12 (60)	15 (65)	1,000	0,980
Mujer	5 (36)	22 (38)	6 (40)	8 (40)	8 (35)		
<b>Raza [n (%)]</b>							
Blanca	9 (64)	37 (64)	9 (60)	14 (70)	14 (61)	0,474	0,967
Negra	2 (14)	12 (21)	4 (27)	3 (15)	5 (22)		
Otro	3 (22)	9 (15)	2 (13)	3 (15)	4 (17)		
<b>Edad gestacional (semanas)</b>	39 [37-40]	40 [38-40]	40 [38-40]	40 [38-40]	39 [37-40]	0,624	0,584
<b>Lactancia materna*</b>	3/14 (21)	18/56 (32)	3/11 (27)	7/17 (41)	6/17 (35)	0,529	0,666
<b>Estado vacunal [n (%)]</b>							
Completo	10 (72)	49 (85)	13 (87)	15 (75)	21 (91)	0,140	0,235
Incompleto	3 (21)	3 (5)	--	3 (15)	--		
Desconocido	1 (7)	6 (10)	2 (13)	2 (10)	2 (9)		
<b>Tabaquismo pasivo*</b>	7/10 (70)	21/44 (47)	7/13 (54)	6/14 (43)	8/17 (47)	0,297	0,582
<b>Asistencia a guardería o hermanos en edad escolar*</b>	7/12 (58)	46/54 (85)	11/15 (73)	17/19 (90)	18/20 (90)	0,049	0,097

**Tabla 8. Características demográficas de los niños con bronquiolitis por VRS que no recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras, según estuvieran colonizados o no por bacterias potencialmente patógenas.** Los datos se expresan como medianas [rango intercuartílico 25%-75%]. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de sujetos en cada grupo. Flora Resp: flora respiratoria comensal. BPP: bacterias potencialmente

patógenas. BGP: bacterias gram-positivas, en concreto *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *Streptococcus* grupo B. BGN: bacterias gram-negativas, en concreto *M. catarrhalis* y *H. influenzae* no tipificable. p (1): comparación entre pacientes colonizados por flora respiratoria y al menos 1 BPP mediante la prueba de la U de Mann-Whitney; p (2): comparación entre pacientes colonizados por flora respiratoria, BGN, BGP y  $\geq 2$  BPP utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.\*En las variables lactancia materna, tabaquismo pasivo y asistencia a guardería o exposición a hermanos en edad escolar, el número de sujetos en los cuales se documentó ese parámetro se incluye en el denominador, y los porcentajes han sido calculados en base a dicho denominador.

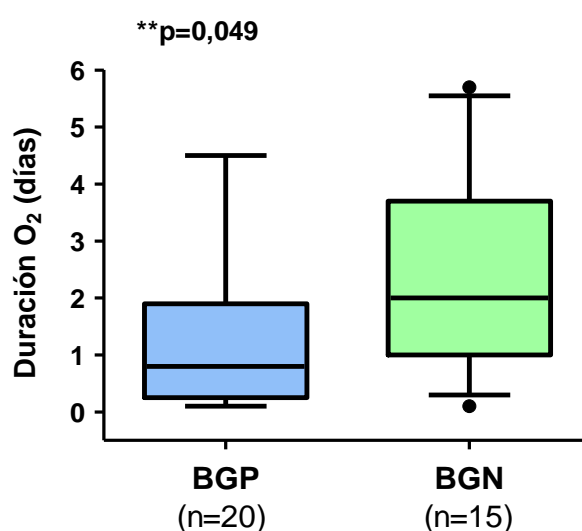
#### 5.4.2.2. Características clínicas y parámetros de gravedad de la enfermedad

La mediana de días de síntomas previos al ingreso hospitalario fue 4 [3-5] días en niños con infección por VRS colonizados por bacterias potencialmente patógenas y 3,5 [2-5] días en los no colonizados ( $p=0,234$ ). Asimismo, tanto la presencia de fiebre como la duración de la misma fueron comparables en pacientes colonizados por bacterias patógenas y en aquellos colonizados por flora respiratoria, aunque las temperaturas tendían a ser más elevadas en el primer grupo ( $38,3^{\circ}\text{C}$  [37,8-38,9] frente a  $37,8^{\circ}\text{C}$  [37,7-38,3], respectivamente;  $p=0,065$ ) (**Tabla 9**).

	Flora Resp. <sup>1,2</sup> (n=14)	Al menos 1 BPP <sup>1</sup> (n=58)	BGN <sup>2</sup> (n=15)	BGP <sup>2</sup> (n=20)	≥2 PPB <sup>2</sup> (n=23)	Valor p <sup>1</sup>	Valor p <sup>2</sup>
Días síntomas previos	3,5 [2-5]	4 [3-5]	5 [3-7]	5 [3-5,5]	4 [3-4]	0,234	0,088
<b>Fiebre:</b>							
Presencia [n (%)]	6 (43)	39 (67)	11 (73)	12 (60)	16 (70)	0,125	0,308
Temp. máx (°C)	37,8 [37,7-38,3]	38,3 [37,8-38,9]	38,3 [37,9-39,2]	38,2 [37,8-38,8]	38,3 [37,7-39,1]	0,065	0,263
Duración (días)	1 [1-3]	2 [1-4]	2 [1-4]	1,5 [1-4]	2,5 [1,5-3]	0,239	0,502
<b>Unidad ingreso [n (%)]</b>							
Planta hospital	12 (86)	52 (90)	14 (93)	17 (85)	21 (91)	0,648	0,885
UCIP	2 (14)	6 (10)	1 (7)	3 (15)	2 (9)		
<b>CDSS</b>	5 [2-6]	5 [3-7]	6 [4-7]	4 [3-7]	5 [2-8]	0,375	0,529
<b>Duración hospitalización (días)</b>	2 [1,7-3,5]	2 [2-3]	3 [2-6]	2 [2-3]	2 [2-3]	0,445	0,329
<b>Oxígeno:</b>							
Sat O <sub>2</sub> basal (%)	89 [86-92]	87 [86-90]	87 [83-89]	87 [86-90]	88 [86-92]	0,303	0,228
Necesidad [n (%)]	9 (64)	47 (81)	14 (93)	17 (85)	16 (70)	0,279	0,158
Duración (días)	1,5 [1,1-2,8]	1,5 [0,5-2,5]	2 [1-3,7]	0,8 [0,2-1,9]	1,5 [0,6-2]	0,347	0,154

**Tabla 9. Características clínicas y parámetros de gravedad de los niños con bronquiolitis por VRS que no recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras, según estuvieran colonizados o no por bacterias potencialmente patógenas.** Los datos se expresan como medianas [rango intercuartílico 25%-75%]. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de sujetos en cada grupo. Flora Resp: flora respiratoria comensal. BPP: bacterias potencialmente patógenas. BGP: bacterias gram-positivas, en concreto *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *Streptococcus* grupo B. BGN: bacterias gram-negativas, en concreto *M. catarrhalis* y *H. influenzae* no tipificable. Para el análisis de datos categóricos se utilizó el test de Chi-cuadrado. p (1): comparación entre pacientes colonizados por flora respiratoria y al menos 1 BPP mediante la prueba de la U de Mann-Whitney; p (2): comparación entre pacientes colonizados por flora respiratoria, BGN, BGP y ≥2 BPP utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Temp: temperatura. UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos. CDSS: Clinical Disease Severity Score (Score Clínico de Gravedad). Sat O<sub>2</sub>: saturación de oxígeno.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la necesidad de oxígeno, saturación de oxígeno basal mínima, la duración de la hospitalización, necesidad de ingreso en UCIP y la puntuación del score de gravedad de la enfermedad entre los grupos (**Tabla 9**), aunque los niños colonizados por bacterias gram-negativas (*M. catarrhalis* o *H. influenzae* no tipificable) precisaron oxígeno suplementario durante más tiempo en comparación con los niños colonizados por bacterias gram-positivas (*S. pneumoniae*, *S. aureus* o *Streptococcus* del grupo B) (2 vs. 0,8 días, respectivamente;  $p=0,049$ ) (**Fig. 29**).



**Figura 29.** Duración del tratamiento con oxígeno suplementario en niños con bronquiolitis por VRS colonizados por bacterias potencialmente patógenas gram-positivas (BGP) y colonizados por bacterias potencialmente patógenas gram-negativas (BGN). O<sub>2</sub>: oxígeno. En el gráfico de cajas, la línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana de los datos y los extremos representan los percentiles 10-90. Para el análisis se utilizó el test de la U de Mann-Whitney.

#### 5.4.2.3. Parámetros de laboratorio en sangre y lavado nasal

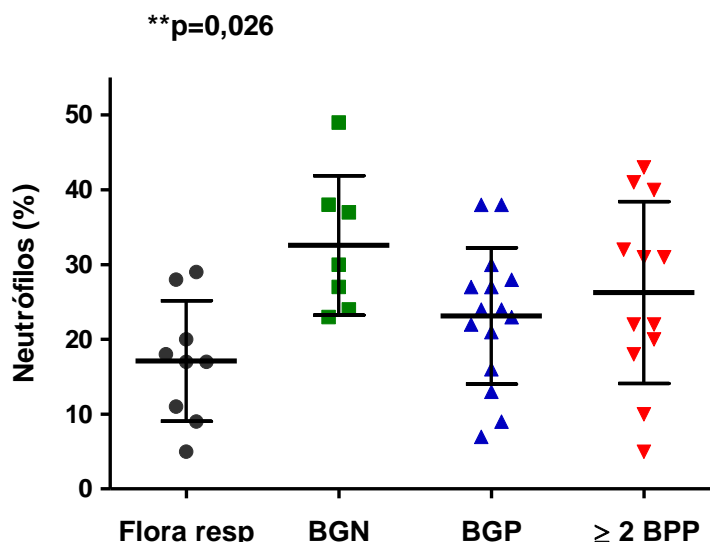
En general, se obtuvo un hemograma en el 60% (43/72) de los pacientes (sin diferencias significativas según el tipo de bacteria presente en la nasofaringe); el 63% de ellos presentó fiebre antes o durante el ingreso. El porcentaje de neutrófilos en sangre periférica fue significativamente mayor en niños con infección por VRS colonizados por bacterias potencialmente patógenas en comparación con los



colonizados por bacterias de la flora respiratoria, especialmente en aquellos colonizados por bacterias gram-negativas (**Fig. 30**). No se encontraron diferencias en el porcentaje de linfocitos o monocitos entre los grupos de estudio (**Tabla 10**).

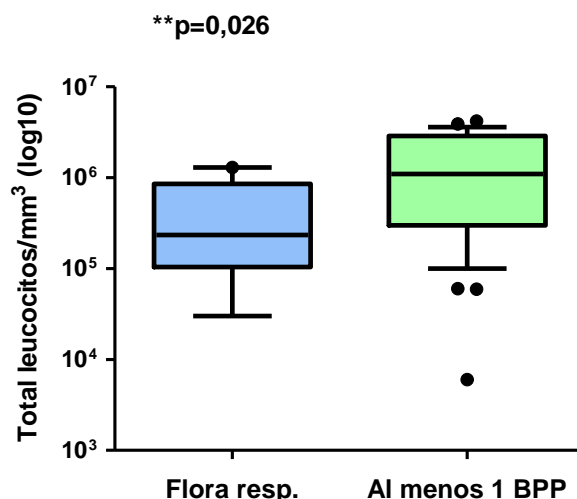
	Flora Resp. <sup>1,2</sup> (n=14)	Al menos 1 BPP <sup>1</sup> (n=58)	BGN <sup>2</sup> (n=15)	BGP <sup>2</sup> (n=20)	≥2 PPB <sup>2</sup> (n=23)	Valor p <sup>1</sup>	Valor p <sup>2</sup>
Realización hemograma [n (%)]	9 (64)	34 (59)	7 (47)	15 (75)	12 (52)	0,769	0,299
Hemograma (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	10,7 [7,3-15,6]	11,3 [8,7-12,6]	9,1 [7,7-12,0]	10,4 [8,9-12,5]	12,1 [9,0-14,2]	0,743	0,671
Neutrófilos %	17,1 ± 8,05	26,1 ± 10,6	32,6 ± 9,3	23,1 ± 9,1	26,2 ± 12,1	0,022	0,026
Linfocitos %	65,2 ± 12,9	56,2 ± 12,3	50,2 ± 12,2	59,8 ± 12,1	55,2 ± 12,2	0,061	0,095
Monocitos %	10,2 ± 4,05	11,1 ± 5,0	12,7 ± 5,2	10,9 ± 6,10	10,3 ± 3,2	0,318	0,731

**Tabla 10. Hemograma y recuento diferencial en los niños con bronquiolitis por VRS que no recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras, según estuvieran colonizados o no por bacterias potencialmente patógenas.** Los datos se expresan como medianas [rango intercuartílico 25%-75%] o medias ± desviación típica. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de sujetos en cada grupo. Flora Resp: flora respiratoria comensal. BPP: bacterias potencialmente patógenas. BGP: bacterias gram-positivas, en concreto *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *Streptococcus* grupo B. BGN: bacterias gram-negativas, en concreto *M. catarrhalis* y *H. influenzae* no tipificable. Hemograma: leucocitos totales en el hemograma de sangre periférica. Para el análisis de datos categóricos se utilizó el test de Chi-cuadrado. p (1): comparación entre pacientes colonizados por flora respiratoria y al menos 1 BPP mediante la prueba de la U de Mann-Whitney o t-Student; p (2): comparación entre pacientes colonizados por flora respiratoria, BGN, BGP y ≥2 BPP utilizando la prueba de Kruskal-Wallis ajustado con el test de Dunn para comparaciones múltiples o el test de análisis de la varianza (ANOVA) ajustado con el test de Holm-Sidak para comparaciones múltiples.



**Figura 30. Porcentaje de neutrófilos en el hemograma de niños con bronquiolitis por VRS que no recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras, según el tipo de colonización nasofaríngea.** Flora Resp: flora respiratoria comensal. BPP: bacterias potencialmente patógenas. BGP: bacterias gram-positivas (*S. pneumoniae*, *S. aureus* y *Streptococcus* grupo B). BGN: bacterias gram-negativas (*M. catarrhalis* y *H. influenzae* no tipificable). En el diagrama de dispersión de puntos, la línea horizontal gruesa determina la media de los datos y los extremos representan  $\pm$ desviación estándar (SD). Para el análisis se utilizó el test de análisis de la varianza (ANOVA) ajustado con el test de Holm-Sidak para comparaciones múltiples.

En las muestras de lavado nasal, el recuento total de leucocitos fue significativamente mayor en los pacientes colonizados por bacterias potencialmente patógenas que en los colonizados por bacterias de la microbiota respiratoria (**Fig. 31**), aunque no se observaron diferencias dependiendo del tipo de bacteria presente en la nasofaringe (BGN, BGP o  $\geq 2$  BPP). El porcentaje de neutrófilos tampoco se vio afectado por la presencia y el tipo de bacterias potencialmente patógenas (**Tabla 11**).



**Figura 31.** Leucocitos totales en lavado nasal de niños con bronquiolitis por VRS colonizados por flora respiratoria o bacterias potencialmente patógenas (BPP). En el gráfico de cajas, la línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana de los datos y los extremos representan los percentiles 10-90. Para el análisis se utilizó el test de la U de Mann-Whitney.

	Flora resp. <sup>1,2</sup> (n=14)	Al menos 1 BPP <sup>1</sup> (n=58)	BGN <sup>2</sup> (n=15)	BGP <sup>2</sup> (n=20)	≥2 PPB <sup>2</sup> (n=23)	Valor p <sup>1</sup>	Valor p <sup>2</sup>
<b>Leucocitos (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>) (log<sub>10</sub>)</b>	5,4 [5,0-5,9]	6,0 [5,5-6,5]	6,1 [5,7-6,5]	6,1 [5,0-6,4]	5,9 [5,7-6,5]	0,026	0,094
<b>Neutrófilos %</b>	95 [90-99]	97 [94-98]	97 [93-97]	96 [93-98]	98 [94-98]	0,617	0,591
<b>qRT-PCR VRS</b>							
<b>Tipo de virus</b>							
VRS A	9 (64)	40 (73)	7 (50)	14 (70)	19 (90)	0,782	0,117
VRS B	4 (29)	11 (20)	6 (43)	3 (15)	2 (10)		
VRS A&B	1 (7)	4 (7)	1 (7)	3 (15)	--		
<b>Carga viral VRS (log<sub>10</sub>)</b>	5,4 ± 0,7	5,5 ± 1,0	5,0 ± 1,1	5,6 ± 1,1	5,7 ± 0,8	0,370	0,228

**Tabla 11.** Parámetros de laboratorio en muestras de lavado nasal en pacientes que no recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras, según la colonización bacteriana. Los datos se expresan como medianas [rango intercuartílico 25%-75%] o medias ± desviación típica. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de sujetos en cada grupo. qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real. Flora Resp: flora respiratoria comensal. BPP: bacterias potencialmente patógenas. BGP: bacterias gram-positivas (*S. pneumoniae*, *S. aureus* y *Streptococcus* grupo B). BGN: bacterias gram-negativas (*M. catarrhalis* y *H. influenzae* no tipificable). Para el análisis de datos categóricos se utilizó el test de Chi-cuadrado. p (1): comparación entre pacientes colonizados por flora respiratoria y al menos 1 BPP mediante la prueba de la U de Mann-Whitney o t-Student; p (2): comparación entre pacientes colonizados por flora respiratoria, BGN, BGP y ≥2 BPP utilizando la prueba de Kruskal-Wallis ajustado con el test de Dunn para comparaciones múltiples o el test de análisis de la varianza (ANOVA) ajustado con el test de Holm-Sidak para comparaciones múltiples.

En relación al tipo de VRS causante de la bronquiolitis aguda (A, B o A+B), encontramos que el tipo A fue el más frecuente en todos los grupos de estudio. Las cargas virales no fueron significativamente diferentes entre los distintos grupos (**Tabla 11**).

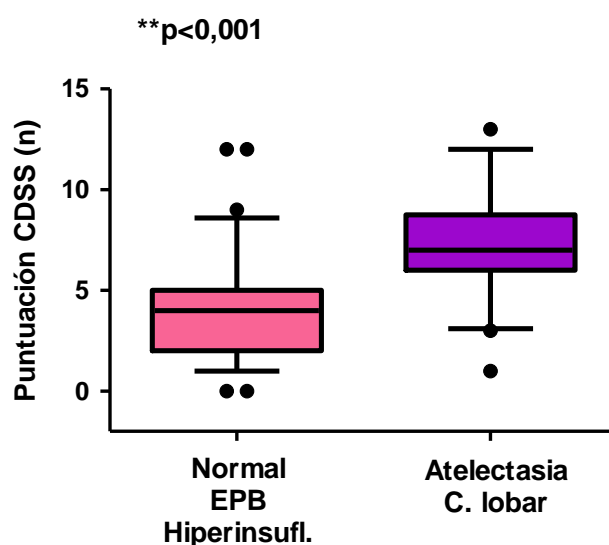
#### 5.4.2.4. Hallazgos radiológicos

En el 88% (51/58) de los niños con bronquiolitis por VRS colonizados por bacterias potencialmente patógenas se obtuvo una radiografía de tórax al ingreso, en comparación con los niños colonizados por flora respiratoria (7/14, 50%;  $p=0,003$ ). Aunque no hubo diferencias significativas en los patrones radiológicos de ambos grupos, se observó hasta un 10% (5/51) de consolidación lobar en el grupo colonizado por al menos una bacteria potencialmente patógena y ningún caso en el grupo colonizado por flora respiratoria (**Tabla 12**).

	Flora Resp. <sup>1,2</sup> (n=14)	Al menos 1 BPP <sup>1</sup> (n=58)	BGN <sup>2</sup> (n=15)	BGP <sup>2</sup> (n=20)	≥2 PPB <sup>2</sup> (n=23)	Valor p <sup>1</sup>	Valor p <sup>2</sup>
<b>Realización Rx tórax [n (%)]</b>	7 (50)	51 (88)	13 (87)	19 (95)	19 (83)	0,003	0,015
<b>Patrón radiológico [n (%)]</b>							
Normal	--	3 (6)	1 (8)	1 (5)	1 (5)	0,691	0,972
EPB o hiperinsuflación	4 (57)	28 (55)	7 (54)	11 (58)	10 (53)		
Atelectasia	3 (43)	15 (29)	3 (23)	6 (32)	6 (32)		
Consolidación lobar	--	5 (10)	2 (15)	1 (5)	2 (10)		

**Tabla 12. Características radiológicas en los niños con bronquiolitis por VRS que no recibieron antibióticos antes de la recogida de las muestras, según estuvieran colonizados o no por bacterias potencialmente patógenas.** Rx: radiografía. EPB: engrosamiento peribronquial. Flora Resp: flora respiratoria normal. BPP: bacterias potencialmente patógenas. BGP: bacterias gram-positivas (*S. pneumoniae*, *S. aureus* y *Streptococcus* grupo B). BGN: bacterias gram-negativas (*M. catarrhalis* y *H. influenzae* no tipificable). Para el análisis se utilizó el test de Chi-cuadrado. p (1): comparación entre pacientes colonizados por flora respiratoria y al menos 1 BPP; p (2): comparación entre pacientes colonizados por flora respiratoria, BGN, BGP y ≥2 BPP. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de sujetos en cada grupo.

También se observó que, en el grupo de niños colonizados por al menos una bacteria potencialmente patógena, los patrones radiológicos de atelectasia o consolidación lobar se asociaron significativamente con mayores puntuaciones del score clínico de gravedad de la enfermedad (CDSS) (7 [6-8,5] en niños con patrón de atelectasia o consolidación lobar, frente a 4 [2-5] en niños con los otros patrones) (**Fig. 32**).



**Figura 32.** Puntuación en el score clínico de gravedad de la enfermedad según el patrón radiológico de niños con bronquiolitis por VRS colonizados por bacterias potencialmente patógenas. EPB: engrosamiento peribronquial. Hiperinsufl: hiperinsuflación. C. lobar: consolidación lobar. En el gráfico de cajas, la línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana de los datos y los extremos representan los percentiles 10-90. Para el análisis se utilizó el test de la U de Mann-Whitney.

Asimismo, los pacientes colonizados por bacterias potencialmente patógenas con los hallazgos radiológicos de atelectasia o consolidación lobar tendieron a precisar más oxígeno suplementario y durante más tiempo que los pacientes con radiografía normal, engrosamiento peribronquial o hiperinsuflación (**Tabla 13**).

	Normal, EPB, hiperinsuflación (n=31)	Atelectasia o consolidación lobar (n=20)	Valor de p
Días síntomas previos	4 [3-5]	5 [4-7]	0,034
<b>Fiebre:</b>			
Presencia [n (%)]	22 (71)	15 (75)	0,995
Temp. máxima (°C)	38,3 [37,9-38,9]	38,3 [37,9-39,1]	0,728
Duración (días)	2 [1-3]	2 [(1,2-4)]	0,443
CDSS (n)	4 [2-5]	7 [6-8,5]	<0,001
Duración hospitalización (días)	2 [2-3]	2,5 [2-5]	0,137
<b>Oxígeno:</b>			
Sat O <sub>2</sub> basal (%)	88 [86-91]	86 [84-88]	0,162
Necesidad [n (%)]	23 (74)	19 (95)	0,072
Duración (días)	1 [0,3-1,5]	1,7 [0,9-3,9]	0,083

**Tabla 13. Características clínicas y determinantes de gravedad según el patrón radiológico de los niños con bronquiolitis por VRS colonizados por bacterias potencialmente patógenas.** EPB: engrosamiento peribronquial. Hiperinsufl: hiperinsuflación. Temp: temperatura. CDSS: Clinical Disease Severity Score (Score Clínico de Gravedad). Sat O<sub>2</sub>: saturación de oxígeno. Para el análisis se utilizó el test de Mann-Whitney para variables continuas y el de Chi-cuadrado para el análisis de datos categóricos. Los datos se expresan como medianas [rango intercuartílico 25%-75%]. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de sujetos en cada grupo.

## 5.5. CITOQUINAS PLASMÁTICAS EN NIÑOS CON BRONQUIOLITIS POR VRS COLONIZADOS POR BACTERIAS POTENCIALMENTE PATÓGENAS

Con el fin de determinar si la colonización bacteriana nasofaríngea en pacientes con VRS representaba un fenómeno pasivo o si, por el contrario, inducía respuestas de la inmunidad innata a nivel sistémico, determinamos la concentración plasmática de las citoquinas inflamatorias IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  en un subgrupo de sujetos de la cohorte principal en los que se obtuvo sangre periférica para dichas mediciones. La muestra, de 44 niños, estaba formada por 34 pacientes con bronquiolitis por VRS (colonizados por flora respiratoria n=7, bacterias gram-negativas n=8 y bacterias gram-positivas n=19) y 10 controles sanos (flora respiratoria n=5, bacterias gram-positivas n=5).

### 5.5.1. Características demográficas, clínicas y de laboratorio de los niños en los que se realizó análisis de citoquinas

Las características demográficas, así como las características radiológicas y clínicas (incluyendo los días de síntomas al ingreso) fueron comparables entre los 4 grupos (**Tabla 14**). Con respecto a los parámetros de laboratorio, al igual que ocurrió en la cohorte principal de 136 pacientes, los porcentajes de neutrófilos y linfocitos en sangre periférica de los controles sanos fueron significativamente diferentes a los obtenidos en pacientes con infección por VRS.

De los 34 pacientes con bronquiolitis, 6 habían recibido antibióticos previamente a la recogida de las muestras (2 en el grupo colonizado por bacterias gram-positivas y 4 en el de niños colonizados por bacterias gram-negativas), por lo que el análisis se realizó con la cohorte total (n=34 pacientes) y también excluyendo a estos pacientes, con resultados similares.

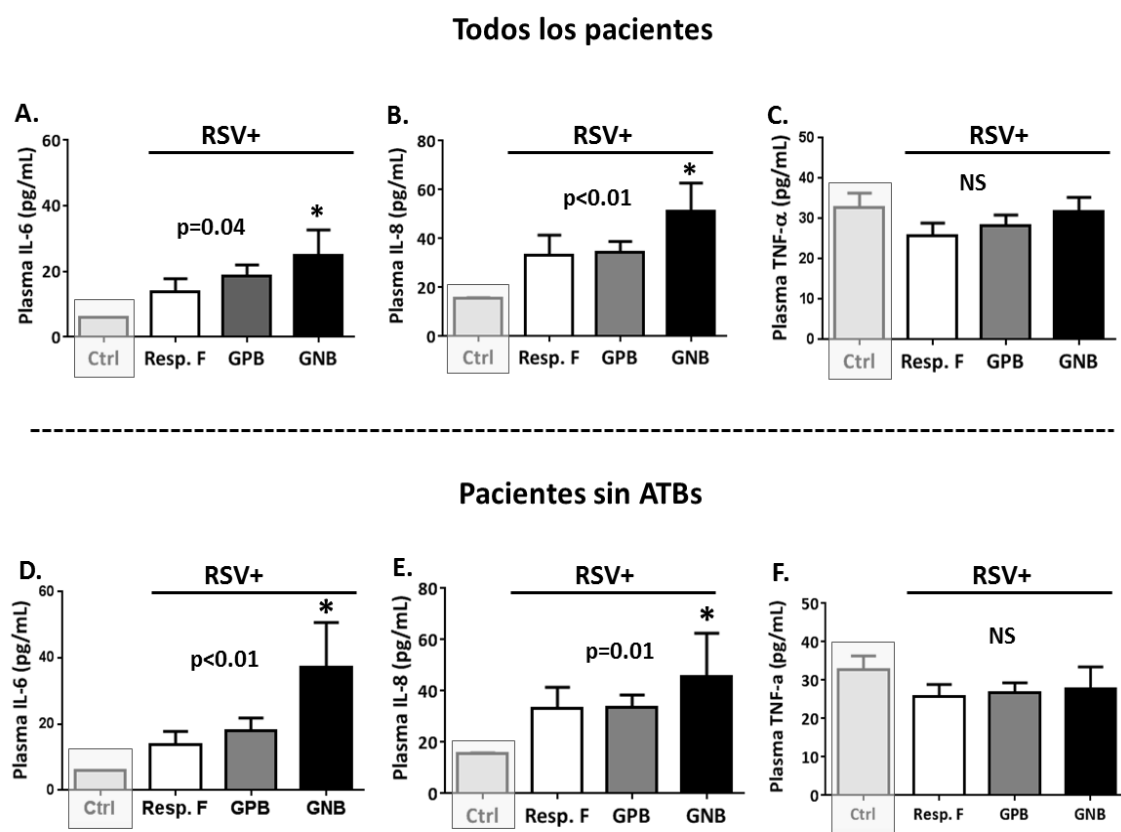
	Controles (n=10)	Flora resp. (n=7)	BGP (n=19)	BGN (n=8)	Valor p
Características demográficas					
Edad (meses)	5,1 [1,3-7,1]	2,0 [0,9-4,6]	2,3 [1,5-3,6]	2,70 [1,9-11,1]	0,171
Sexo [n (%)]					
Varón	7 (70)	4 (57)	12 (63)	4 (50)	0,828
Mujer	3 (30)	3 (43)	7 (37)	4 (50)	
Parámetros de laboratorio y características radiológicas					
Hemograma (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	8,6 [6,9-9,4]	11,9 [7,2-19]	11,3 [9,2-14,6]	9,9 [7,9-12]	0,234
Neutrófilos %	16,5 [11,5-18,7]	32 [17,2-38,2]	29 [18-34]	30 [30-39]	0,010
Linfocitos %	74 [69,7-77,5]	58 [50-65]	61 [49-67]	54 [46-65]	0,005
Realización Rx tórax [n (%)]	NA	4 (57)	18 (95)	6 (75)	0,068
Patrón radiológico [n (%)]					
EPB o hiperinsuflación	NA	1 (25)	10 (55)	3 (50)	0,716
Atelectasia o II		3 (75)	7 (39)	3 (50)	
Consolidación lobar		--	1 (6)	--	
Características clínicas					
Días síntomas previos	NA	3 [2-4]	4 [3-5]	3.5 [3-6,7]	0,675
Tratamiento ATB previo [n (%)]	--	--	2 (10)	4 (50)	0,019
CDSS (n)	NA	5 [4-7]	4 [3-7]	5,5 [3,2-6,7]	0,988
Unidad ingreso [n (%)]					
Planta hospitalización	NA	6 (86)	16 (84)	7 (87,5)	0,975
UCIP		1 (14)	3 (16)	1 (12,5)	
Oxígeno:					
Necesidad [n (%)]	NA	6 (86)	17 (89)	6 (75)	0,625
Duración (días)		2,3 [1,3-3,2]	1,2 [0,3-2,0]	1,5 [0,9-3,1]	0,271
Duración hospitalización (días)	NA	3 [2-5]	2 [2-4.7]	2 [2-3]	0,400

**Tabla 14. Características demográficas, clínicas, radiológicas y de laboratorio de los pacientes con bronquiolitis por VRS y controles sanos en los que se realizó análisis de citoquinas.** Los datos se expresan como medianas [rango intercuartílico 25%-75%]. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de sujetos en cada grupo. Para el análisis se utilizó el test de Kruskal-Wallis para variables continuas y el de Chi-cuadrado para el análisis de datos categóricos. BGP: bacterias gram-positivas (*S. pneumoniae*, *S. aureus* y *Streptococcus* grupo B). BGN: bacterias gram-negativas (*M. catarrhalis* y *H. influenzae* no tipificable). Hemograma: leucocitos totales en el hemograma de sangre periférica. EPB: engrosamiento peribronquial. II: infiltrados intersticiales. CDSS: Clinical Disease Severity Score (Score Clínico de Gravedad).



### 5.5.2. Concentración de citoquinas plasmáticas en relación al tipo de bacteria potencialmente patógena aislada en la nasofaringe

Independientemente del tipo de colonización en los controles sanos, las concentraciones de IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  estuvieron consistentemente por debajo del límite de detección del ensayo. Sin embargo, en lactantes con bronquiolitis por VRS, las concentraciones plasmáticas de IL-6 e IL-8 fueron significativamente mayores sólo en aquellos colonizados por bacterias gram-negativas, y además este efecto se demostró incluso tras excluir a los pacientes que habían recibido antibióticos. En relación a las concentraciones plasmáticas de TNF- $\alpha$ , no hubo diferencias significativas entre los grupos (Fig. 33).

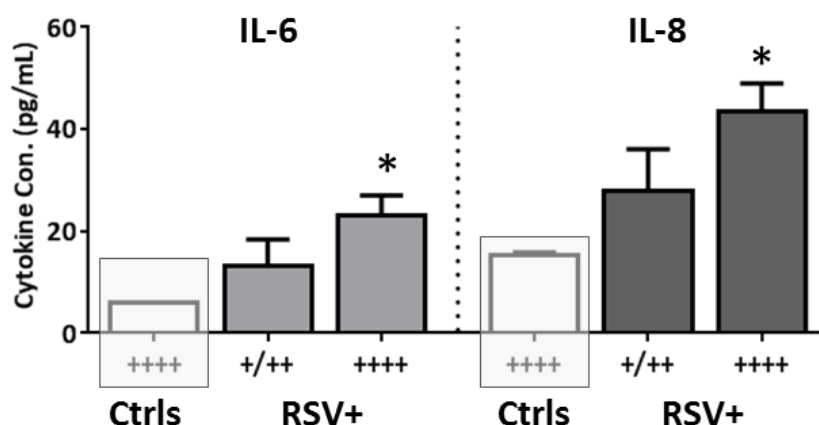


**Figura 33. Concentraciones de citoquinas en plasma de acuerdo con el tipo de colonización bacteriana de la nasofaringe.** Las concentraciones plasmáticas de IL-6 (A&D), IL-8 (B&E) y TNF- $\alpha$  (C&F) se midieron en un subconjunto de controles sanos (Ctrl, n=10, color gris claro) y niños con bronquiolitis por VRS colonizados por flora respiratoria (Resp. F; n=7, blanco), bacterias gram-positivas (GPB; n=19, gris oscuro) y bacterias gram-negativas (GNB, n=8, negro). El panel superior (A-C) representa las concentraciones de citoquinas en todos los niños, independientemente de la utilización de antibióticos, y el panel inferior (D-F) el subconjunto de los niños que no recibieron antibióticos. Los gráficos de barras representan la media  $\pm$  SD. Las comparaciones se realizaron con el test de análisis de la varianza (ANOVA) ajustado con el

test de Dunnett para comparaciones múltiples. Los asteriscos indican el grupo (GNB) que es significativamente diferente en relación con los controles ( $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los niños colonizados por flora respiratoria o bacterias gram-positivas y los controles sanos.

### 5.5.3. Relación citoquinas-densidad bacteriana nasofaríngea

Para determinar si había un efecto dosis-respuesta entre la densidad bacteriana y las concentraciones de citoquinas en plasma en el subgrupo de pacientes en los que se midieron citoquinas, analizamos las diferencias de IL-6 e IL-8 en plasma en base a la densidad bacteriana. De los 27 niños con bronquiolitis por VRS colonizados por bacterias gram-positivas ( $n=19$ ) o bacterias gram-negativas ( $n=8$ ), el 26% (7/27) presentaron una densidad bacteriana definida como escasa o poca y el 74% (20/27) una densidad moderada o abundante. Por otra parte, 5 de los 10 controles sanos analizados presentaron un cultivo positivo para bacterias potencialmente patógenas, y en todos ellos se identificó un crecimiento bacteriano moderado o abundante. Se observó que la mayor carga bacteriana nasofaríngea se asoció con un aumento de las concentraciones plasmáticas de IL-6 e IL-8 sólo en pacientes con infección por VRS colonizados por bacterias gram-negativas o bacterias gram-positivas, pero no en los controles sanos (**Fig. 34**). Este efecto también se demostró al excluir a los pacientes que recibieron antibióticos. No se observó ningún efecto de la carga bacteriana en las concentraciones de TNF- $\alpha$  en ninguno de los grupos de estudio.



**Figura 34. Concentraciones plasmáticas de IL-6 e IL-8 de acuerdo con la densidad nasofaríngea de bacterias potencialmente patógenas.** Las barras blancas representan las concentraciones de citoquinas en los controles sanos (Ctrls), las barras de color gris claro representan las concentraciones plasmáticas de IL-6 y las barras de color gris oscuro las de IL-8 para aquellos pacientes con infección por VRS (RSV+) en los que se aisló una bacteria gram-negativa o gram-positiva con crecimiento de escasas o pocas colonias bacterianas (representado como +/++) y moderadas o abundantes (representado como ++++). Los gráficos de barras representan la media  $\pm$  SD. Las comparaciones se realizaron con el test de ANOVA para IL-6 e IL-8 por separado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el crecimiento moderado/abundante en los pacientes con bronquiolitis y los controles sanos (IL-6;  $p=0,01$  e IL-8;  $p=0,003$ ).

#### 5.5.4. Relación citoquinas-gravedad de la bronquiolitis por VRS

Por último, las concentraciones plasmáticas de citoquinas no se asociaron a los parámetros de la gravedad de la bronquiolitis en este subgrupo de 34 pacientes estudiados; sin embargo, las concentraciones de IL-6 se correlacionaron positivamente con la duración del tratamiento con oxígeno suplementario ( $r=0,68$ ;  $p=0,04$ ), sólo en los niños con infección por VRS colonizados por bacterias gram-negativas.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

El objetivo fundamental de este estudio fue caracterizar en detalle las tasas de colonización bacteriana nasofaríngea en una cohorte de niños menores de 2 años hospitalizados con un primer episodio de bronquiolitis aguda por VRS, a fin de determinar si la colonización por bacterias potencialmente patógenas se asocia a mayor gravedad clínica así como a cambios en la respuesta inflamatoria local y sistémica. Asimismo, se evaluó el efecto de los antibióticos sobre la colonización nasofaríngea y se comparó la evolución clínica de los pacientes expuestos o no a antibióticos.

Resumimos brevemente los hallazgos más importantes de este estudio, los cuales se detallarán a continuación: **(A)** Encontramos que, a pesar de que las guías pediátricas desaconsejan el uso rutinario de antibióticos en el manejo de lactantes con bronquiolitis, los antibióticos se usaron frecuentemente en esta cohorte de niños hospitalizados por infección por VRS, lo que se asoció con una menor probabilidad de recuperar bacterias potencialmente patógenas en los cultivos convencionales. Además documentamos que los pacientes tratados con antibióticos mostraron una mayor gravedad de la enfermedad, definida por parámetros clínicos y hallazgos radiológicos. **(B)** Descubrimos también que los lactantes infectados por el VRS estaban colonizados por bacterias potencialmente patógenas con más frecuencia y con una mayor proporción de bacterias gram-negativas (*H. influenzae* no-tipificable y *M. catarrhalis*) que los controles sanos de edades similares. **(C)** La colonización por bacterias potencialmente patógenas se asoció con un mayor porcentaje de neutrófilos en sangre y un mayor número de leucocitos en el lavado nasal con neutrófilos como subpoblación celular predominante, especialmente en aquellos colonizados por bacterias gram-negativas. **(D)** Además, la colonización por bacterias gram-negativas en lactantes con VRS se asoció a una mayor duración de oxígeno suplementario en comparación con la colonización por bacterias gram-positivas (*S. pneumoniae*, *S. aureus* y *Streptococcus* del grupo B), independientemente de la unidad de ingreso. **(E)** Por último, documentamos que sólo los lactantes infectados por el VRS colonizados por bacterias gram-negativas, en comparación con el grupo control no infectado y con los lactantes con VRS colonizados por bacterias gram-positivas, presentaron concentraciones aumentadas de IL-8 e IL-6 en plasma, lo que se

correlacionó con mayores necesidades de oxígeno suplementario. La densidad bacteriana en la nasofaringe de lactantes con bronquiolitis por VRS se asoció proporcionalmente con un efecto dosis-respuesta a las concentraciones plasmáticas de estas dos citoquinas proinflamatorias (IL-8 e IL-6), sugiriendo que la colonización bacteriana nasofaríngea en esta enfermedad podría ser un fenómeno activo.

## 6.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS DE LA COHORTE

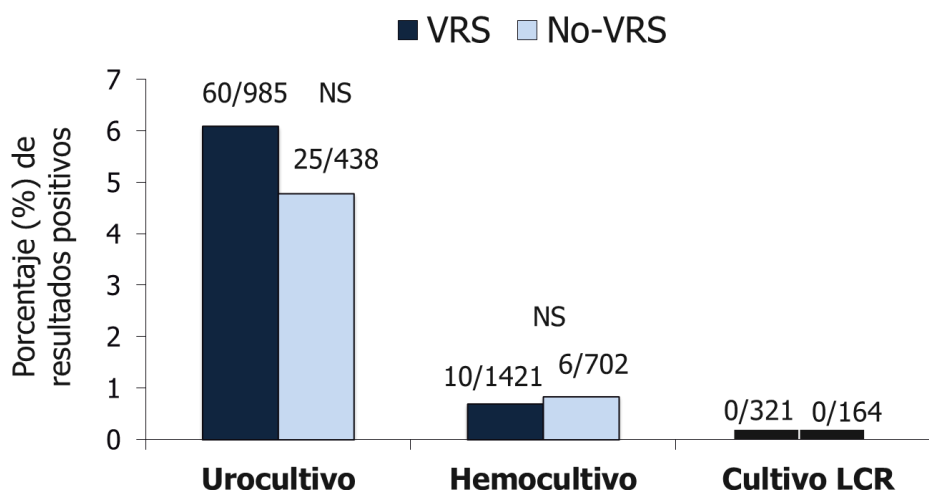
En este estudio de muestreo por conveniencia se analizaron las características clínicas y las muestras de 136 niños menores de 2 años (la mayoría lactantes entre 2-3 meses de edad) hospitalizados por un primer episodio de bronquiolitis por VRS y las de 23 controles sanos, de edad y sexo similar. Se sabe que más del 90% de los niños experimenta una infección por VRS antes de los 2 años y el 0,5-2% de ellos precisa hospitalización.<sup>58-60</sup> Por tanto, nuestra cohorte de lactantes con bronquiolitis por VRS, a pesar de ser una cohorte seleccionada, representa el grupo de edad más afectado por esta infección. Numerosos autores destacan que la edad, *per se*, es un factor de riesgo de enfermedad grave en la infección por VRS, sobre todo los menores de 3 meses,<sup>44,61,69,166</sup> lo que se confirma en nuestros resultados, ya que el 93% de los lactantes era menor de 1 año y el 61% de ellos tenía menos de 3 meses de vida, con una mediana de edad de la cohorte de 2,5 [1,5-4,4] meses. Por otra parte, estudios observacionales han documentado que entre el 10% y el 20% de los niños que ingresan por bronquiolitis por VRS necesitarán ingreso en la unidad de cuidados intensivos pediátricos (UCIP) en algún momento de su evolución,<sup>58,152,153</sup> siendo la gran mayoría de ellos niños previamente sanos, sin comorbilidades clásicamente asociadas con un aumento de morbi-mortalidad en relación a la infección por VRS.<sup>7-10,63,154,155</sup> Nuestro grupo de pacientes con infección por VRS (compuesto, igualmente, por niños previamente sanos) constituye, por ello, una muestra representativa de la población infantil más afectada por la enfermedad grave por el VRS. Parece evidente, por tanto, que existen factores de riesgo desconocidos o poco estudiados que podrían determinar una evolución más grave de la enfermedad por VRS en el grupo de niños previamente sanos. Definir dichos condicionantes de gravedad es de vital importancia



en una enfermedad tan prevalente, ya que la identificación de los lactantes con riesgo de presentar una peor evolución clínica permitiría instaurar un mejor manejo de estos pacientes. En este contexto, nuestro propósito fue estudiar en una cohorte de lactantes previamente sanos, de similares características demográficas y epidemiológicas, hospitalizados con distintos grados de gravedad, si la colonización nasofaríngea por bacterias potencialmente patógenas podría ser uno de esos factores que contribuyera a una mayor gravedad o peor evolución clínica.

## 6.2. INFECCIONES BACTERIANAS EN EL CONTEXTO DE LA BRONQUIOLITIS POR VRS

Diferentes estudios retrospectivos y prospectivos han intentado documentar la frecuencia de bacteriemia y de las infecciones bacterianas graves en el contexto de la infección por VRS. Consistentemente, estos estudios demuestran que menos de un 1% desarrollarán una infección bacteriana invasiva (meningitis y/o bacteriemia),<sup>60,288,289</sup> y alrededor del 6% presentará una infección del tracto urinario.<sup>8,289-295</sup> (Fig. 35).



**Figura 35. Infecciones bacterianas graves en niños menores de 2 años ingresados por bronquiolitis (VRS vs. no-VRS).** Estudio retrospectivo desde 2002 a 2007: 4285 niños (VRS; n=2840, no-VRS; n=1145). NS: no significativo. Modificado de García CG et al.<sup>8</sup>

Con respecto a la neumonía bacteriana asociada a la infección por VRS, el diagnóstico es difícil. Aproximadamente el 25% de los niños con bronquiolitis presentan atelectasias en la radiografía de tórax, las cuales son difíciles de diferenciar de la consolidación lobar,<sup>60,296</sup> que además no es exclusiva de infección bacteriana pulmonar.<sup>32</sup> Además, menos de un 5% de las neumonías pediátricas desarrollan bacteriemia,<sup>297-301</sup> y generalmente no se realizan técnicas invasivas como el lavado broncoalveolar o la punción pleural/pulmonar,<sup>297,302,303</sup> lo que dificulta enormemente el diagnóstico etiológico y por lo que probablemente la incidencia real de sobreinfecciones bacterianas podría estar infravalorada.

Estudios realizados en diferentes partes del mundo han utilizado el lavado broncoalveolar o el aspirado endotraqueal para determinar las tasas de coinfección bacteriana en pacientes con bronquiolitis por VRS que necesitaron ingreso en la UCIP, representando por tanto las formas más graves de la enfermedad.<sup>152,304-308</sup> En base a estos estudios, las tasas de neumonía (calculadas de forma indirecta en base a las cultivos bacterianos endotraqueales) en pacientes con bronquiolitis grave oscilan entre el 20%-40% (**Tabla 15**).<sup>152,304-306,309</sup> En todos los casos, los patógenos más frecuentemente identificados fueron *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* y *S. aureus*.

País y año	Método diagnóstico	Niños de alto riesgo	N	Ventilación mecánica	% posible neumonía bacteriana
EE.UU. 2004	CET	No	165	63	23%
Suiza 2004	CET	ND	127	57	43%
Países Bajos 2005	Clínico; Rx; HC y CET	Premat, EPC, CC	82	65	26%
Reino Unido* 2006	BAL	CC, EPC, ID, AN vía aérea	165	165	22%
Austria 2007	HC y CET	Premat, EPC, CC, FQ	36	ND	28%
EE.UU.* 2010	Clínico; Rx; CET	No	23	23	30%

\*Estudios prospectivos

Randolph AG. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:990.

Duttweiler L. *Arch Dis Child* 2004; 89:1155

Kneyber MC. *Intensive Care Med* 2005; 31:680

Thorburn K. *Thorax* 2006;61:611.

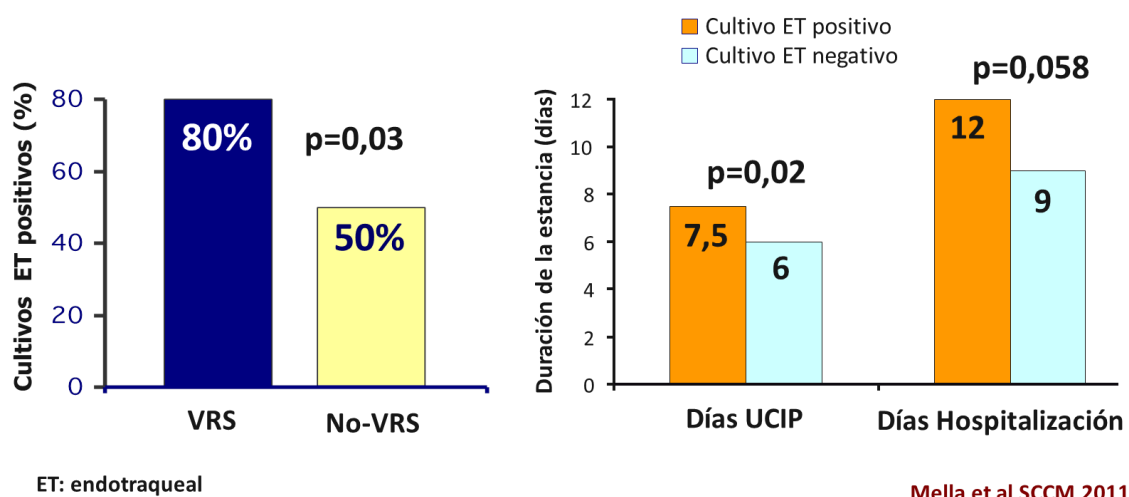
Resch B. *Acta Paediatr* 2007;96:495.

Levin D. *Pediatr Crit Care Med* 2010;11:390.

**Tabla 15. Estudios sobre el VRS y la neumonía bacteriana en niños con infección respiratoria grave.** CET: cultivo endotraqueal; Rx: radiografía de tórax; HC: hemocultivo; BAL: lavado broncoalveolar; Premat: prematuridad; EPC: enfermedad pulmonar crónica; CC: cardiopatía congénita; ID: inmunodeficiencia; AN vía aérea: anomalías congénitas de la vía aérea; FQ: fibrosis quística; ND: sin datos. (Modificado de Levin D et al).<sup>309</sup>

Los resultados de estos estudios sugieren que los niños con infección grave por VRS que precisan asistencia respiratoria en la UCIP podrían tener tasas de neumonía bacteriana más elevadas que los niños que no presentan un fallo respiratorio.<sup>309</sup> Aunque en algunos de estos trabajos se incluyeron niños con comorbilidades como prematuridad, cardiopatía congénita o enfermedad pulmonar crónica, las cuales se han propuesto como factores de riesgo de una mayor gravedad de la enfermedad por VRS, algunos autores como Levin et al<sup>309</sup> y Randolph et al<sup>305</sup> demostraron que la neumonía bacteriana también puede ser frecuente en niños previamente sanos con infección grave por el VRS. Además, se ha demostrado que los pacientes con cultivos endotraqueales positivos a alguna bacteria precisan soporte ventilatorio durante más tiempo que aquellos con cultivos estériles.<sup>304,306</sup> Por último, datos preliminares de un estudio realizado en nuestro hospital por Mella et al<sup>310</sup> en 125 niños menores de 2 años ingresados en la UCIP con bronquiolitis grave (74% positivos para VRS),

mostraron que los lactantes intubados con infección por el VRS presentaban significativamente más cultivos endotraqueales positivos que aquellos no infectados por el VRS (80% vs 50%, respectivamente;  $p=0,03$ ) (datos no publicados). Asimismo, los pacientes (VRS positivo y VRS negativo) con cultivos endotraqueales positivos tenían una estancia en UCIP más prolongada (7,5 vs 6 días,  $p=0,02$ ) y un aumento de la estancia hospitalaria total (12 vs 9 días,  $p=0,058$ ) en comparación con aquellos con cultivos negativos (**Fig. 36**). *Haemophilus spp.* y/o *Moraxella spp.* (54%) y *S. pneumoniae* (19%) fueron los patógenos bacterianos cultivados con más frecuencia. Todos estos datos parecen indicar que las bacterias potencialmente patógenas presentes en el tracto respiratorio inferior de los pacientes intubados con bronquiolitis por VRS podrían contribuir a la gravedad de su enfermedad respiratoria.



**Figura 36. Cultivos de tubo endotraqueal y duración de la hospitalización en niños con bronquiolitis ingresados en la UCIP de Nationwide Children's Hospital (2009–10).** Modificado de Mella et al.<sup>310</sup>

Por otra parte, se sabe que, en general, la infección bacteriana más frecuente en el lactante con bronquiolitis es la otitis media aguda (OMA).<sup>311-313</sup> Aunque los virus por sí solos pueden causar OMA,<sup>281,314</sup> parece, sin embargo, que no todos los virus predisponen de la misma manera a esta enfermedad.<sup>311,315</sup> En concreto, el VRS es el virus más frecuentemente asociado a OMA,<sup>311,315-318</sup> a la que parece contribuir de

forma independiente,<sup>281</sup> y ha demostrado ser un co-patógeno fundamental en el desarrollo de esta enfermedad.<sup>35,319</sup> La infección viral en la nasofaringe ocasiona disfunción de la trompa de Eustaquio, lo que conlleva a una reducción de la presión en el oído medio, forzando a las bacterias que colonizan la nasofaringe a adentrarse en el oído medio.<sup>207,319,320</sup> Por tanto, el riesgo de OMA varía también en función del número y tipo de bacterias potencialmente patógenas asociadas a OMA (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis*) que colonizan la nasofaringe.<sup>15,316</sup> Se estima que el 50-70% de los lactantes desarrollan OMA durante la bronquiolitis por VRS o poco después, siendo *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, seguidas por *M. catarrhalis* y *S. aureus*, las bacterias más frecuentemente identificadas.<sup>312,313,321-325</sup> Además, se observa que durante los episodios de OMA, las tasas de colonización nasofaríngea y la densidad bacterianas aumentan.<sup>15,218,222,281,326-328</sup> Por tanto, si en el contexto de la infección por VRS los episodios de OMA son frecuentes y probablemente asociados a las bacterias potencialmente patógenas presentes en la nasofaringe, ¿por qué dichas bacterias no podrían asociarse también a infecciones del tracto respiratorio inferior? Esta fue una de nuestras preguntas principales y motivo por el que decidimos realizar el estudio presentado.

### **6.3. EL TRATAMIENTO CON ANTIBIÓTICOS ES FRECUENTE Y MODIFICA SIGNIFICATIVAMENTE LOS PATRONES DE COLONIZACIÓN NASOFARÍNGEA EN NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS CON BRONQUIOLITIS POR VRS**

Numerosos estudios documentan la alta frecuencia de administración de antibióticos en la bronquiolitis y específicamente en la infección por el VRS.<sup>32,152,329,330</sup> El porcentaje de niños con bronquiolitis que reciben antibióticos oscila entre 10% y el 50%,<sup>331-339</sup> dependiendo de la población de estudio (Servicio de Urgencias vs. pacientes hospitalizados), siendo estas tasas aún mayores en pacientes ingresados en las Unidades de Cuidados Intensivos Pediátricos o Neonatales.<sup>32</sup> Nuestros resultados se encuentran en consonancia con estos datos, ya que observamos que el 47% de los pacientes había recibido al menos una dosis de antibiótico antes de su inclusión en el estudio. Además, la administración de antibioterapia fue significativamente mayor en la UCIP, donde el 75% de los niños había recibido antibióticos en comparación con el

38,5% de los que fueron ingresados en la planta. Varios ensayos clínicos controlados aleatorizados han demostrado que la antibioterapia de rutina no aporta ningún beneficio a los niños con bronquiolitis, sobre todo en aquellos con infección por VRS no complicada.<sup>340-343</sup> El principal problema de estos estudios es que se trataron todos los pacientes por igual, sin tener en cuenta el tipo de patógeno que potencialmente podría asociarse a enfermedad más grave o si había indicios de coinfección bacteriana. Se necesitan estudios dirigidos con la ayuda de otros biomarcadores para poder identificar si es necesario el uso de antibióticos y si es así que subgrupo de pacientes se podría beneficiar de los mismos.

En el año 2006 la Academia Americana de Pediatría (AAP)<sup>296</sup> publicó unas guías para el diagnóstico y manejo de la bronquiolitis aguda en las que establecía que *“la antibioterapia sólo debe usarse en niños con bronquiolitis que tienen indicaciones específicas de la coexistencia de una infección bacteriana”*. En los años posteriores a la publicación de este documento se han realizado estudios observacionales para evaluar el impacto de estas guías y de otros documentos de consenso en el diagnóstico y tratamiento de la bronquiolitis. Estos estudios han mostrado diferencias importantes en los periodos pre y post implementación de las guías; específicamente, tras la implementación de la guías se ha objetivado una disminución de la realización de radiografías de tórax,<sup>333-335,338,339,344</sup> de la administración de broncodilatadores (salbutamol/albuterol y adrenalina)<sup>333,335,339,344,345</sup> y de corticoides.<sup>333-335,339,344</sup> Sin embargo, en general, no se observó una disminución de la administración de antibióticos.<sup>333-337,339,346</sup> Más recientemente, la AAP<sup>60</sup> ha publicado una actualización de estas guías, cuyas directrices sugieren que los antibióticos deben usarse sólo en los casos de bronquiolitis con coinfección bacteriana documentada por pruebas de cultivo o técnicas moleculares de diagnóstico,<sup>347</sup> y en niños con bronquiolitis grave ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos que requieran intubación y ventilación mecánica por fallo respiratorio.<sup>306,309,330</sup> Sin embargo, a pesar de estas recomendaciones, los antibióticos se siguen usando en exceso, y los motivos más habituales por los que los lactantes con bronquiolitis reciben tratamiento antibiótico son la presencia de fiebre, la menor edad, el aspecto “tóxico” y la preocupación de los médicos acerca de que no se esté detectando una infección bacteriana secundaria.<sup>32,60,152,334,348</sup> Otra de las

recomendaciones de la AAP, muy relacionada con la administración de antibióticos, es que en el momento actual no se aconseja la realización rutinaria de radiografías de tórax en el manejo de la bronquiolitis, debido a su escasa utilidad en el diagnóstico etiológico de la infección del tracto respiratorio inferior y porque se ha comprobado que los niños a los que se les realiza una radiografía de tórax tienen más probabilidad de recibir tratamiento antibiótico.<sup>60</sup> En base a la evidencia científica actual, la radiografía inicial debe reservarse para los casos con dificultad respiratoria grave que precisen ingreso en la UCIP o cuando exista una complicación de las vías respiratorias (p.ej. neumotórax).<sup>60</sup> Aun así, los datos demuestran que se sigue realizando radiografía de tórax a aproximadamente el 50% de los niños con bronquiolitis.<sup>349</sup> Nuestros resultados denotan esta alta frecuencia de estudios radiológicos, ya que en todos los lactantes ingresados en la UCIP y en el 78% de los ingresados en la planta de hospitalización se realizó una radiografía de tórax. Además, en nuestro estudio, los pacientes que recibieron tratamiento antibiótico presentaban más frecuentemente el hallazgo de consolidación lobar que los que no fueron tratados con antibióticos, además de precisar oxigenoterapia durante más tiempo. Estos resultados sugieren, al menos en el estudio que realizamos, que los pacientes que recibieron antibióticos podrían representar de alguna manera un fenotipo más grave de la enfermedad.

Con respecto al efecto de los antibióticos sobre la colonización nasofaríngea, observamos que sólo se aislaron bacterias potencialmente patógenas en el 30% de los niños que recibieron tratamiento antibiótico, en comparación con hasta el 81% de los que no lo hicieron ( $p < 0,001$ ). Además, observamos que el tratamiento antibiótico previo a la recogida de los frotis nasofaríngeos reducía significativamente no sólo nuestra capacidad para detectar bacterias potencialmente patógenas (OR 9,8) sino también la densidad (OR 3,4) de las mismas en el cultivo bacteriano convencional. Nuestros hallazgos coinciden con Deng et al,<sup>237</sup> quienes señalaron recientemente que la administración de antibióticos disminuía considerablemente la capacidad de aislamiento en los cultivos bacterianos. Además, diversos autores han observado que los antibióticos alteran la microbiota habitual de la nasofaringe, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, aumentando la susceptibilidad de colonización e infección por potenciales patógenos respiratorios.<sup>350-352</sup> También se ha demostrado

que la administración de antibióticos disminuye la colonización nasofaríngea por bacterias potencialmente patógenas, si bien es cierto que esta disminución suele ser incompleta y de corta duración.<sup>206,207,271,353-358</sup> Este efecto reductor de la colonización se observa desde los primeros días de tratamiento,<sup>359,360</sup> incluso tras recibir una única dosis de antibióticos.<sup>361</sup> Además, durante el tratamiento antibiótico o poco después del mismo se produce un rápido reemplazo de cepas, ya sea por sobrecrecimiento de las poblaciones más resistentes que estaban enmascaradas por las poblaciones sensibles o por la adquisición de nuevas cepas.<sup>206,353,355,359,362</sup> Debido a que un alto porcentaje de pacientes en nuestra cohorte (47%) recibió tratamiento antibiótico previo y por tanto no pudimos evaluar en esos pacientes el impacto de la colonización bacteriana en relación a los parámetros clínicos o de laboratorio, realizamos los análisis de gravedad y respuesta inflamatoria local y sistémica en el subgrupo de lactantes que no habían estado expuestos a antibióticos desde la semana anterior al momento de la recogida de las muestras.

#### **6.4. COLONIZACIÓN BACTERIANA NASOFARÍNGEA EN LACTANTES INFECTADOS POR EL VRS Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS**

En general, se sabe que en la infancia la colonización nasofaríngea por potenciales patógenos respiratorios es amplia, entre los que destacan *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis* por su implicación en las infecciones respiratorias de la infancia.<sup>11-13,202,209,363</sup> Además, la colonización por múltiples especies es frecuente en la edad pediátrica.<sup>206</sup> En nuestro estudio encontramos que los lactantes previamente sanos ingresados por un primer episodio de bronquiolitis por VRS estaban colonizados más frecuentemente por bacterias potencialmente patógenas que los controles sanos (81% vs 65%, respectivamente) y presentaban una mayor proporción de colonización por más de una bacteria potencialmente patógena (32% vs 4%;  $p=0,023$ ). Asimismo, observamos que las diferencias de colonización entre los lactantes infectados por el VRS y los controles sanos no eran sólo cuantitativas, sino también cualitativas. Aunque *S. aureus* fue la bacteria identificada de forma aislada en más ocasiones en ambos grupos, los pacientes con bronquiolitis por VRS estaban



colonizados con una mayor proporción de bacterias gram-negativas (*H. influenzae* no tipificable y *M. catarrhalis*) en comparación con los controles sanos (43% vs 7%, respectivamente), los cuales estaban más frecuentemente colonizados por bacterias gram-positivas (*S. aureus*, *S. pneumoniae* y *Streptococcus* del grupo B) (57% en pacientes VRS vs 93% en controles sanos;  $p=0,01$ ). Puesto que tanto los pacientes como los controles eran previamente sanos sin patología de base y sus características epidemiológicas y socio-económicas eran similares, estos datos nos inducen a pensar si el VRS podría favorecer de alguna manera la virulencia de ciertas especies bacterianas en la nasofaringe de los niños infectados.

Se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales, que los virus ocasionan una alteración del epitelio respiratorio, aumentando la adherencia bacteriana y facilitando una posterior sobreinfección bacteriana.<sup>206,225,246,247,257</sup> Además, numerosos estudios realizados en niños muestran que la colonización nasofaríngea por bacterias potencialmente patógenas aumenta significativamente durante las infecciones virales del tracto respiratorio superior.<sup>15,23,222,235,238,364-366</sup> En otros trabajos, las infecciones respiratorias víricas agudas también se han relacionado con un aumento de la densidad bacteriana<sup>238,367</sup> y de la colonización por múltiples bacterias o serotipos de la misma especie,<sup>364,368</sup> tal y como observamos en nuestro estudio.

El riesgo de colonización por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis* parece incrementar en presencia de determinados virus,<sup>13,238,239</sup> lo que sugiere que existen interacciones específicas virus-bacteria.<sup>22,198,226,240</sup> En el modelo de chinchilla, la infección por VRS se ha relacionado con un aumento de colonización por *H. influenzae* no tipificable de hasta 100 veces en el tracto respiratorio superior,<sup>247</sup> y en el modelo murino con una disminución de la eliminación de *S. pneumoniae* en el tejido pulmonar de ratones, con el consiguiente aumento de invasividad, gravedad de la enfermedad pulmonar, pérdida de peso y mayor mortalidad.<sup>224,260,261</sup>

En humanos, quizá el ejemplo más estudiado ha sido la asociación del virus influenza con un riesgo aumentado de colonización por *S. aureus* y, sobre todo, por *S. pneumoniae* evidenciado clínicamente durante las epidemias y pandemias de la

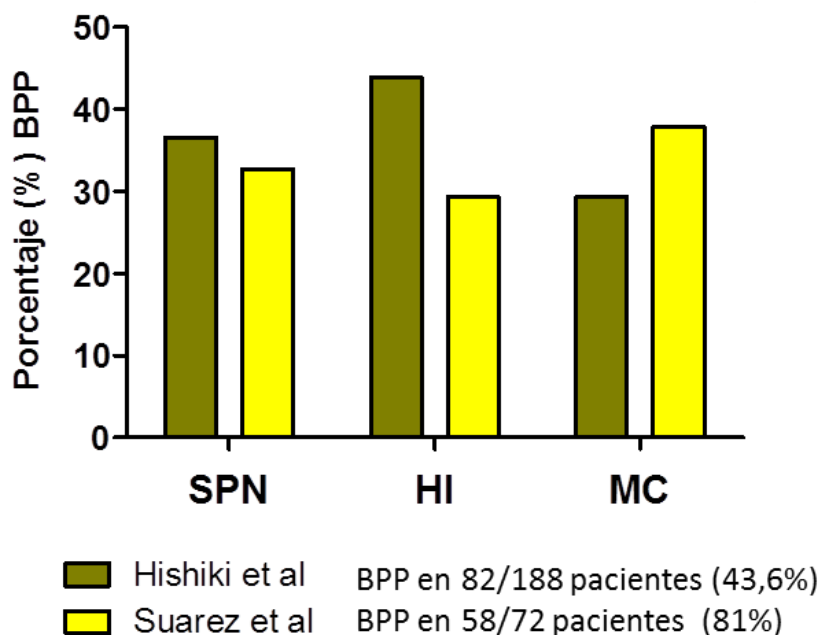
gripe.<sup>13,241-243,245,369,370</sup> Otros autores, como Ampofo et al<sup>264</sup> o Weinberger et al,<sup>269</sup> han destacado la contribución del VRS a la patogenia de la infección invasiva por *S. pneumoniae* en niños, con especial interés en la neumonía. De hecho, estos y otros estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre el pico de actividad del VRS y el pico de incidencia de infecciones invasivas por neumococo.<sup>264,265,267-269,371,372</sup>

Sin embargo, poco se conoce sobre el impacto de la colonización nasofaríngea en la población pediátrica en un momento crucial como el contexto de bronquiolitis aguda, sobre todo en la producida por el VRS, ya que la mayoría de estudios incluyen niños mayores de 2 años de edad, lo que no refleja con exactitud el pico de edad y la principal población diana de la infección grave por el VRS. En un estudio realizado en China en niños menores de 30 meses, se observó que los niños con bronquiolitis aguda estaban colonizados por al menos una bacteria potencialmente patógena en un 56% de los casos.<sup>19</sup> Resultados muy similares fueron encontrados por Jartti y colaboradores<sup>18</sup> en niños menores de 3 años evaluados con un primer episodio de sibilancias producidas por virus, donde se documentó que hasta el 60% de los pacientes estaban colonizados por bacterias potencialmente patógenas, con proporciones de 31% para *M. catarrhalis*, 25% para *S. pneumoniae* y 21% para *H. influenzae*. En una cohorte alemana de niños de 0 a 16 años de edad con infecciones del tracto respiratorio inferior (sibilancias agudas o neumonía) asociadas al VRS en menos del 50% de los casos, también se observaron tasas de colonización bacteriana nasofaríngea alrededor del 66%.<sup>17</sup> Las tasas de colonización de nuestro estudio son ligeramente superiores (81%), si bien en estos tres estudios el porcentaje de detección del VRS se encontraba aproximadamente entre el 30-50% de todos los virus identificados.

Algunos estudios epidemiológicos han relacionado la infección específica por VRS con un aumento de la colonización bacteriana nasofaríngea. En un estudio publicado en Japón, se observó que el 44% de los niños menores de 5 años ingresados por una infección del tracto respiratorio inferior producida por VRS estaban colonizados por bacterias potencialmente patógenas, siendo las 3 más frecuentes *H. influenzae* (43,9%), *S. pneumoniae* (36,6%), and *M. catarrhalis* (29,3%).<sup>278</sup> Dichas tasas de colonización por patógeno respiratorio son bastante similares a las que

encontramos en nuestro estudio (29,3%, 32,7% y 37,9%, respectivamente) (**Fig. 37**). Hyde y sus colaboradores<sup>22</sup> encontraron un aumento de colonización nasofaríngea por *H. influenzae* y *M. catarrhalis* en bronquiolitis producidas por VRS o por VRS + rinovirus. Sin embargo, ninguno de los dos trabajos anteriores contaba con un grupo control y el rango de edad estudiado en el primero de ellos era más amplio. En otro estudio realizado en Vietnam en niños menores de 5 años con neumonía, los autores demostraron que la coinfección neumococo-VRS, entre otros virus, aumentaba de forma significativa la densidad bacteriana nasofaríngea, en comparación con los niños sin coinfección viral.<sup>367</sup> Resultados similares se encontraron en otro trabajo realizado en Italia,<sup>373</sup> donde la neumonía comunitaria de patrón alveolar en niños menores de 5 años con infección por VRS o rinovirus se asoció con una mayor densidad nasofaríngea de *S. pneumoniae* identificado por técnicas de PCR. Específicamente, estos niños con infección por VRS colonizados por *S. pneumoniae* y en los que se documentó una neumonía de patrón alveolar presentaban saturaciones de oxígeno más bajas y una tasa de hospitalización mayor que los niños sin este patrón radiológico.<sup>373</sup>

Por lo tanto, en base a lo que se ha demostrado en estudios previos de investigación básica y en la población pediátrica por otros investigadores, y aunque aún hacen falta estudios mecanísticos que demuestren causalidad, nuestros resultados apoyarían la hipótesis de que, en el contexto de la infección por el VRS, el virus podría facilitar un cambio en el patrón de colonización bacteriana y/o aumentar la virulencia de bacterias potencialmente patógenas en la nasofaringe de los pacientes infectados.



**Figura 37. Comparación de las tasas de colonización por tipo de bacteria potencialmente patógena (BPP) en niños con infección del tracto respiratorio inferior por VRS (total de aislamientos de cada bacteria/número de muestras positivas para al menos una BPP). SPN: *S. pneumoniae*; HI: *H. influenzae*; MC: *M. catarrhalis*. Hishiki et al:<sup>278</sup> esputo inducido. Suárez-Arrabal et al:<sup>374</sup> frotis nasofaríngeo.**

#### 6.4.1. Relación de la colonización bacteriana con la gravedad de la bronquiolitis

Los datos sobre el papel de la colonización bacteriana en relación a la gravedad clínica de los niños con bronquiolitis son aún más limitados, en especial los que corresponden a la infección por el VRS. Jartti et al<sup>18</sup> demostraron que la colonización bacteriana nasofaríngea (tasa de colonización del 60%, establecida mediante cultivo bacteriano nasofaríngeo positivo) por potenciales patógenos respiratorios (*H. influenzae*, *M. catharralis*, y *S. pneumoniae*) en niños menores de 3 años con un primer episodio de sibilancias se asociaba con una mayor duración de la hospitalización y mayor riesgo de sibilancias recurrentes. En otro trabajo realizado por Yu y sus colaboradores<sup>19</sup> en niños menores de 3 años con bronquiolitis (edad media de 7 meses) o sibilancias recurrentes inducidas por virus se observó que las tasas de colonización bacteriana eran elevadas (56% y 82% respectivamente); sin embargo, en este estudio la colonización bacteriana no se asoció a mayor duración de la hospitalización. En ninguno de estos estudios observacionales se tuvo en cuenta la

etiología viral y las poblaciones a estudio eran heterogéneas, lo que hace difícil poder generalizar los resultados. Es por eso que nosotros limitamos la inclusión de niños con bronquiolitis a aquellos con un primer episodio de bronquiolitis por VRS, menores de dos años (mediana de edad 2,5 meses), para definir mejor el impacto de la colonización bacteriana nasofaríngea en la población diana de la infección grave por el VRS.

En nuestro estudio, aunque el análisis no alcanzó la significación estadística posiblemente por problemas de tamaño muestral, observamos que hasta un 10% de los niños colonizados por al menos una bacteria potencialmente patógena presentaba el hallazgo radiológico de condensación lobar en comparación con ningún caso en el grupo no colonizado por estas bacterias. Tenenbaum y colaboradores<sup>17</sup> estudiaron la colonización nasofaríngea de 311 pacientes de entre 0 y 16 años con bronquiolitis o neumonía, y encontraron que aquellos colonizados de forma aislada por *H. influenzae*, *M. catarrhalis* o *S. pneumoniae* eran diagnosticados más frecuentemente de neumonía confirmada por radiología (según los criterios de la OMS)<sup>375</sup> que los niños colonizados por *S. aureus*. Sin embargo, en este trabajo, las infecciones del tracto respiratorio inferior por VRS como único agente viral eran menos del 50%. En nuestro estudio observamos además que los lactantes colonizados por bacterias potencialmente patógenas y con hallazgos radiológicos de atelectasia o condensación alveolar presentaban una enfermedad más grave, definida por una mayor puntuación en el score clínico de gravedad utilizado, además de una tendencia a precisar más oxígeno suplementario y durante más tiempo en comparación con los pacientes que presentaron radiografía de tórax normal, engrosamiento peribronquial o hiperinsuflación.

Por último, en nuestro estudio encontramos que los pacientes colonizados específicamente por *M. catarrhalis* o *H. influenzae* precisaron oxígeno suplementario durante más tiempo en comparación con aquellos colonizados por *S. pneumoniae*, *S. aureus* o *Streptococcus* del grupo B. Curiosamente, Teo y sus colaboradores, en un reciente estudio sobre el microbioma nasofaríngeo durante el primer año de vida, observaron que los niños con infección del tracto respiratorio inferior producida por VRS que estaban colonizados por *M. catarrhalis* experimentaban fiebre con mayor

frecuencia.<sup>23</sup> En suma, estos resultados indicarían que la sinergia entre la infección por VRS y la colonización nasofaríngea por bacterias con potencial patogénico en el lactante pequeño podría contribuir a la gravedad de la infección del tracto respiratorio inferior, especialmente la colonización por determinadas especies bacterianas, en cierta forma parecido a lo que ocurre en las interacciones VRS-bacteria que ocasionan la otitis media aguda.<sup>23,247,319</sup>

#### 6.4.2. Respuesta local y sistémica a la colonización bacteriana

Con el fin de entender si la colonización bacteriana en el contexto de la bronquiolitis por VRS era un fenómeno pasivo o si, por el contrario, se asociaba a cambios inflamatorios a nivel de la mucosa respiratoria y/o sistémico y si esta respuesta, a su vez, se relacionaba con la evolución o la gravedad de la enfermedad, determinamos en nuestro estudio la celularidad proinflamatoria en el lavado nasal de estos niños, así como las concentraciones de dos citoquinas relacionadas con la inmunidad innata, la IL-6 y la IL-8, cuya función principal es atraer a los neutrófilos.

Se sabe que el VRS produce una activación de la respuesta inmunitaria, con reclutamiento inicial a la mucosa respiratoria de las células de la inmunidad innata (neutrófilos y/o células dendríticas)<sup>5,48,119</sup> e incremento de citoquinas proinflamatorias tanto a nivel local como sistémico.<sup>2,83,100,131</sup> Durante la infección por VRS, los neutrófilos son una de las primeras células que migran desde la sangre periférica hasta el lugar de la infección, la mucosa respiratoria, donde se adhieren a las células infectadas y sufren una activación metabólica que contribuye a la fisiopatología de la enfermedad.<sup>84,124,127</sup> De hecho, los neutrófilos son el tipo de leucocito predominante en la bronquiolitis por el VRS,<sup>125</sup> lo que concuerda con nuestros resultados. Sin embargo, los neutrófilos también han demostrado ser las células predominantes durante las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior.<sup>84,376,377</sup> Específicamente, la colonización por *H. influenzae* y *M. catarrhalis* se ha asociado con una mayor producción de citoquinas (como IL-6 e IL-8) en células del epitelio nasofaríngeo *in vitro* y también en estudios epidemiológicos en niños.<sup>378-380</sup> Se ha comprobado que la secreción de interleuquinas, sobretodo de la IL-8, aumenta la

granulopoiesis y ejerce una acción quimotáctica sobre los macrófagos y neutrófilos hacia el lugar de la colonización, aumentando la eliminación bacteriana y limitando dicha colonización.<sup>381,382</sup> En nuestro caso, observamos que los pacientes colonizados por bacterias gram-negativas (*M. catarrhalis* o *H. influenzae*) presentaban un aumento de las concentraciones plasmáticas de IL-6 e IL-8 con respecto a los controles sanos, y que la densidad de la colonización por bacterias potencialmente patógenas se asociaba a mayores concentraciones plasmáticas de IL-6 e IL-8. Además, observamos que los lactantes colonizados por bacterias potencialmente patógenas presentaban mayores cifras de leucocitos en el lavado nasal (97% de neutrófilos) y un porcentaje mayor de neutrófilos en sangre, en especial aquellos colonizados por bacterias gram-negativas.

Parece plausible, por tanto, que exista cierto sinergismo entre el VRS y las bacterias de la nasofaringe al estimular la respuesta inmune innata no sólo a nivel local, sino también a nivel sistémico, la cual podría ser diferente según la especie que colonice la mucosa respiratoria. En los pacientes de nuestro estudio con infección por VRS colonizados por bacterias gram-negativas, tanto las concentraciones de IL-6, que a su vez se correlacionaron con la duración del tratamiento con oxígeno suplementario, como de IL-8 fueron significativamente mayores que las de los controles no infectados (mayoritariamente colonizados por bacterias gram-positivas). En consecuencia, estos datos iniciales sugieren que la colonización bacteriana que coexiste con la infección por VRS no es un fenómeno pasivo y que podría ser un factor de gravedad a tener en cuenta en la evaluación del lactante con bronquiolitis por VRS.

Tras todo lo expuesto, lo que queda aún por validar es si la respuesta inmune local y sistémica que observamos en nuestro estudio es fruto de la infección por el VRS, de la colonización por bacterias potencialmente patógenas o podría ser una combinación de las respuestas inmunitarias originadas por ambos microorganismos. Aunque preliminares, nuestros resultados sugieren que la infección por el VRS podría alterar la microbiota de la nasofaringe del huésped facilitando la colonización por las bacterias gram-negativas y posiblemente promoviendo su virulencia, lo que se asociaría a cambios en la respuesta inflamatoria local y sistémica y a un aumento de la gravedad clínica.

## 6.5. ¿CÓMO DIFERENCIAR COLONIZACIÓN DE INFECCIÓN? EL PAPEL DE LOS BIOMARCADORES

Algunos autores han comprobado que, incluso en niños sanos y asintomáticos, se encuentran numerosas asociaciones entre virus y bacterias, lo cual puede influir en el nicho ecológico de la nasofaringe y determinar estados de salud y enfermedad.<sup>13,198,208,363</sup> Con el avance en las técnicas de diagnóstico molecular, como la PCR, la pirosecuenciación, se han identificado múltiples microorganismos en el contexto de las infecciones respiratorias, lo que ha mejorado nuestra comprensión sobre la patogénesis de estas infecciones, pero a su vez ha complicado la determinación del papel causal de cada microorganismo en la patogénesis y las características clínicas de la enfermedad.<sup>13,383,384</sup> Por tanto, aunque se aislen bacterias potencialmente patógenas en la nasofaringe de niños con cuadros respiratorios, y en nuestro caso con infección por VRS; aunque observemos que estas poblaciones bacterianas aumentan o varían en el caso de una infección respiratoria viral, y aunque hayamos observado que el perfil de citoquinas que se detecta durante la bronquiolitis por VRS en lactantes colonizados por ciertas especies de bacterias potencialmente patógenas es diferente, hacen falta estudios que utilicen biomarcadores y estudios que analicen de forma global la respuesta del huésped a la infección, para poder así diferenciar de forma más precisa la colonización vs. la infección.

**6.5.1. Densidad bacteriana:** Aunque el aislamiento de una bacteria potencialmente patógena en el tracto respiratorio superior no conlleva necesariamente que esa misma bacteria esté produciendo una infección invasiva pulmonar,<sup>18,385</sup> Greenberg et al<sup>386</sup> han documentado que lo más probable es que el serotipo de neumococo que coloniza la nasofaringe de los niños con neumonía sea también responsable del cuadro de afectación del tracto respiratorio inferior. En este sentido, en los últimos años se observa un interés creciente en el desarrollo de técnicas para aumentar el rendimiento de la identificación microbiológica y su cuantificación en muestras del tracto respiratorio superior que nos permitan extrapolar de forma fiable la información sobre las bacterias potencialmente patógenas que se encuentran en el tracto respiratorio inferior y determinar su implicación en las infecciones bacterianas pulmonares.<sup>373,383,385</sup> Es por ello que varios



estudios han intentado relacionar la densidad bacteriana de la nasofaringe con la infección del tracto respiratorio inferior con datos contradictorios,<sup>16,238,367,368,373,385</sup> con la premisa de que densidades altas de una bacteria potencialmente patógena en la nasofaringe de un niño con el diagnóstico de neumonía, podrían reflejar la capacidad de diseminación de esa bacteria hacia el tracto respiratorio inferior, produciendo la infección pulmonar. Vu y sus colaboradores,<sup>367</sup> a pesar de encontrar que los niños con neumonía presentaban una mayor densidad nasofaríngea de *S. pneumoniae* que los niños con otras infecciones del tracto respiratorio inferior y los controles sanos, demostraron que la densidad de *S. pneumoniae* no era clínicamente útil y no servía como test para el diagnóstico de neumonía. También se ha sugerido que el aumento de la densidad de la colonización puede aumentar la probabilidad de microaspiraciones bacterianas y, con ello, la probabilidad de neumonía.<sup>238,387</sup> Charlson et al<sup>214</sup> observaron que el pulmón sano contenía pequeñas poblaciones bacterianas indistinguibles de las encontradas en la nasofaringe, que posiblemente habían llegado al pulmón a través de microaspiraciones. Por lo tanto, durante una infección respiratoria, momento en el cual la colonización bacteriana aumenta, se incrementa por una parte la probabilidad de diseminación contigua y, por otra, la probabilidad de microaspiraciones. Es posible que la medición de la densidad bacteriana nasofaríngea pudiera ser de utilidad en el diagnóstico de neumonía si se establecieran unos criterios validados o puntos de corte por encima de los cuales pudiéramos diferenciar colonización de infección bacteriana, los cuales no existen en la actualidad.<sup>214,373,387</sup> Por tanto, hacen falta otros parámetros que ayuden a diferenciar de forma más objetiva el papel que juegan estos patógenos en el momento de la identificación, probablemente a través de estudios de la respuesta del huésped a la infección.

**6.5.2. Biomarcadores convencionales:** Los marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva y la procalcitonina (PCT) también se han utilizado para identificar las coinfecciones bacterianas en pacientes con y sin infecciones virales respiratorias, como en las temporadas anuales de la gripe.<sup>388</sup> En general, los valores de proteína C reactiva y PCT tienden a ser más elevados en las infecciones bacterianas en comparación con las infecciones víricas, aunque el valor predictivo negativo de estos marcadores es limitado.<sup>237,389</sup> Algunos estudios han examinado el rol de la PCT en

niños con neumonía, pero los resultados han sido contradictorios y no ofrecen conclusiones definitivas: mientras que unos autores destacan su valor para diferenciar la etiología viral de la bacteriana,<sup>390-392</sup> otros disienten en este aspecto y sólo la relacionan con la gravedad de la neumonía o el hallazgo radiológico de condensación alveolar.<sup>393,394</sup>

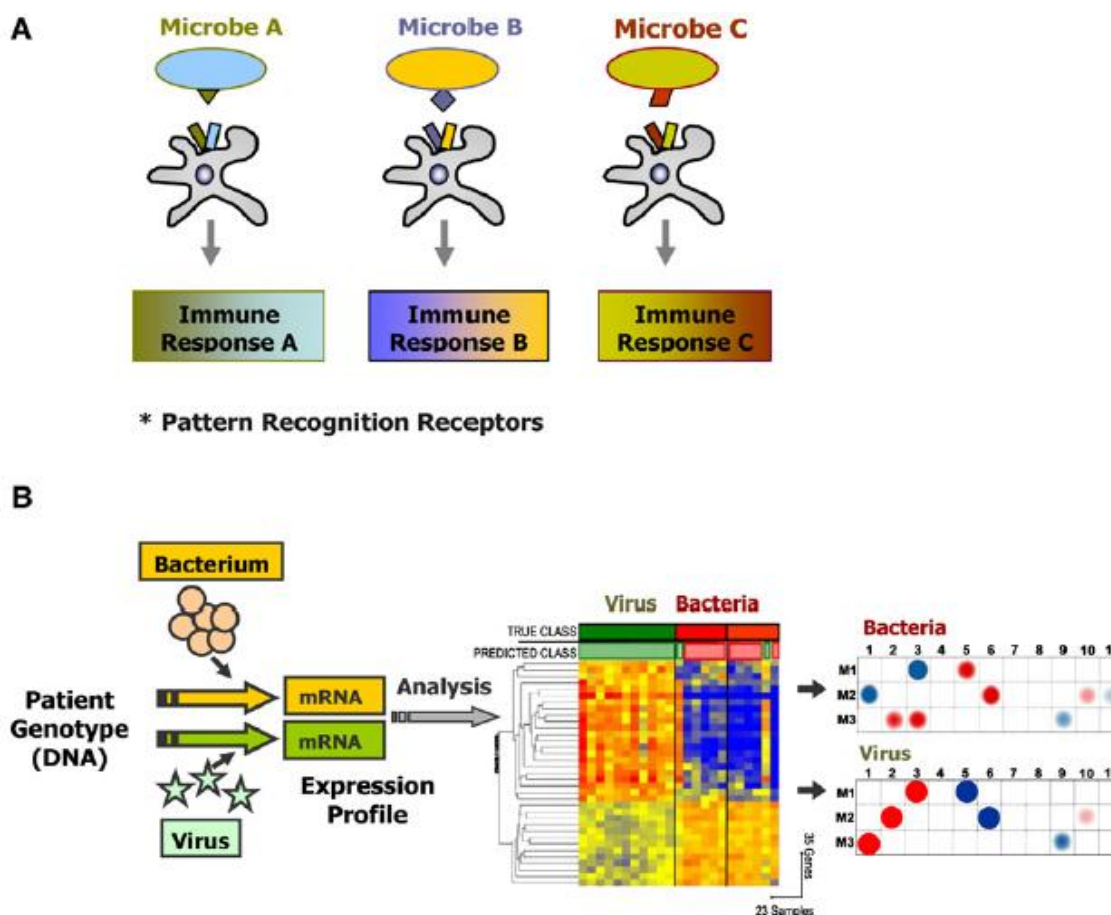
Hasta la fecha ninguna combinación de marcadores inflamatorios no específicos ha sido capaz de distinguir la neumonía bacteriana de la viral,<sup>395</sup> y no existe ningún test que por sí solo diferencie la etiología bacteriana de otras etiologías de la infección del tracto respiratorio inferior, ya que con frecuencia los puntos de corte se superponen,<sup>237,390</sup> por lo que dichas pruebas deben combinarse siempre con la evaluación clínica y otras exploraciones complementarias adicionales.<sup>388</sup> Con respecto a la utilidad de ambos biomarcadores para diferenciar la colonización bacteriana de la infección, los estudios son limitados e inexistentes en pediatría. En una revisión sobre las aplicaciones de la PCT, se ofrece un resumen de siete escenarios clínicos hipotéticos en los cuales la PCT podría utilizarse en combinación con los métodos microbiológicos para diferenciar colonización de infección bacteriana, coinfección virus-bacteria, etc. en el contexto de una infección del tracto respiratorio inferior.<sup>396</sup> **(Tabla 16).**

¿Detección de patógeno bacteriano?	¿Detección de patógeno viral?	Nivel de Procalcitonina (ng/ml)	Interpretación
No	No	≤0,05	No evidencia de infección bacteriana o vírica
No	No	0,5–1.000	Inmunidad innata activada; sospecha de bacteria no aislada en cultivo (p. ej. anaerobios)
No	Sí	≤0,05	Infección viral
No	Sí	0,25–1.000	Co-infección viral y bacteriana; error al identificar la etiología bacteriana
Sí	Sí	0,25–1.000	Co-infección viral y bacteriana
Sí	No	≤0,05	Colonización bacteriana
Sí	Sí	≤0,05	Colonización bacteriana e infección viral

**Tabla 16. Utilidad de los niveles de procalcitonina en la interpretación de los datos de microbiología clínica en pacientes con infecciones del tracto respiratorio inferior.** (Modificado de: Gilbert DN).<sup>396</sup>

Sin embargo, este biomarcador, aunque tiene un elevado valor predictivo negativo, no es óptimo por diferentes motivos e incluso puede detectarse en niveles bajos en casos de infección bacteriana temprana en los que la respuesta inmune innata aún no se ha activado, por lo que no debe usarse como único método diagnóstico para evaluar la respuesta inflamatoria del huésped y diferenciar colonización de infección.<sup>396-398</sup>

**6.5.3. Nuevos biomarcadores:** Parecen necesarias, por tanto, otras técnicas o marcadores que nos ayuden a diferenciar entre colonización e infección y a dilucidar el papel de los virus y bacterias implicados en las infecciones respiratorias y específicamente en la población infectada por el VRS. ¿Pero cómo llegar a estas conclusiones en la presencia de comunidades polimicrobianas tan diversas? Un enfoque atractivo para resolver este dilema podría ser consultar la respuesta del huésped de forma global. ¿Cómo responde el huésped a la presencia de los microorganismos presentes en la mucosa respiratoria? ¿Cómo es capaz de discriminar entre bacterias comensales y patógenas? ¿Cómo y de qué manera se ponen en marcha las respuestas inmunes innatas y adaptativas ante los potenciales patógenos respiratorios y cómo se modulan en caso de salud y enfermedad? En este sentido, en los últimos años han surgido herramientas para estudiar la respuesta del huésped, como la proteómica, la metabolómica o la transcriptómica.<sup>399,400</sup> Con respecto al análisis transcripcional, algunos grupos han investigado la expresión génica en los leucocitos de sangre periférica y han demostrado la utilidad de estas herramientas para diferenciar las respuestas que se producen en las infecciones virales de las bacterianas y en las infecciones sintomáticas de las asintomáticas.<sup>401-404</sup> Los perfiles de expresión génica revelan, incluso, patrones específicos según el patógeno de cada enfermedad y han demostrado ser superiores a otros marcadores tradicionales, como la procalcitonina, para el diagnóstico de infecciones bacterianas vs. víricas del tracto respiratorio inferior (**Fig. 38**).<sup>401,402,405</sup>



**Figura 38. Perfiles de expresión genómica del huésped: un nuevo enfoque para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.** (A) Los diferentes patógenos, al interactuar de forma específica con los receptores de reconocimiento que se expresan en las células inmunes, desencadenan respuestas inmunitarias específicas y distintas que se pueden medir. (B) Gracias a la tecnología de microarrays, podemos medir las diferencias en los patrones de expresión genómica presentes en las células inmunes de la sangre en respuesta a diversos agentes infecciosos. Los genes que se encuentran activados se muestran en color rojo, y los suprimidos en color azul. Modificado de: Ramilo O y Mejías A.<sup>406</sup>

En un estudio de Zaas et al.<sup>403</sup> realizado en un grupo de pacientes con infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad, este tipo de tecnología permitió diferenciar con un 100% de precisión a los pacientes con infección por influenza A de los controles sanos, y con un 93% a los pacientes con infecciones respiratorias bacterianas de las virales. Aunque el tamaño muestral fue pequeño, Hu y sus colaboradores<sup>402</sup> demostraron que los niños con infección vírica febril presentaban perfiles de expresión genómica diferentes de aquellos niños asintomáticos en los que también se detectaron esos virus. Además, los perfiles transcripcionales consiguieron diferenciar con un 95% de acierto a los niños con fiebre y una infección viral o

bacteriana. Datos más recientes en proceso de publicación han demostrado, por primera vez, en una cohorte de 151 niños menores de 2 años, que los perfiles de expresión genómica en niños asintomáticos en los que se detectó rinovirus fueron completamente diferentes a aquellos identificados en niños del mismo rango de edad pero con enfermedad por rinovirus leve o grave. Por ello, los autores concluyen que las técnicas de estudio del huésped mediante transcriptómica representan una herramienta útil para diferenciar detección de infección.<sup>407</sup> Por otra parte, los perfiles de expresión genómica también se han utilizado para generar una puntuación genómica de gravedad (“distancia molecular a la salud”) que permite correlacionar los marcadores clínicos de gravedad con la expresión genómica del huésped de forma objetiva. A este respecto, Mejias et al,<sup>127</sup> en una cohorte de 135 niños menores de 2 años con bronquiolitis por VRS, definieron una puntuación de gravedad genómica que se correlacionó significativamente con la puntuación de gravedad clínica, con la duración de la estancia hospitalaria y la duración del tratamiento con oxígeno suplementario.

Por tanto, las herramientas que estudian la respuesta del huésped nos proporcionan una valiosa información sobre la respuesta inmune específica que induce cada agente infeccioso y cómo ésta se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. Además, en conjunción con otros métodos microbiológicos, nos permitirían establecer si el patógeno que identificamos en una muestra clínica está produciendo una infección o simplemente es un mero colonizador o espectador. El reto ahora consiste en poder implementar de forma simultánea todas estas herramientas en la práctica clínica para poder dirigir el manejo del paciente de forma más personalizada.

## 6.6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Somos conscientes de las limitaciones de nuestro estudio. **(A)** En primer lugar, un gran porcentaje de niños recibió antibióticos antes de su reclutamiento, lo que disminuyó el aislamiento de bacterias potencialmente patógenas y produjo una disminución del tamaño muestral que limitó algunos de los análisis estadísticos. Además, al excluir a los pacientes expuestos a antibióticos de algunos análisis se podría

haber introducido un sesgo, ya que, de los pacientes excluidos, muchos pertenecían al grupo ingresado en la UCIP, por lo que no pudimos comparar si los perfiles de colonización bacteriana en lactantes con una enfermedad más grave eran diferentes a los de los pacientes de la planta de hospitalización con enfermedad más leve. Sin embargo, a pesar del relativamente pequeño tamaño muestral de nuestro estudio, analizamos un subconjunto homogéneo de 72 niños no tratados con antibióticos y encontramos que la colonización nasofaríngea por bacterias potencialmente patógenas se asociaba con un aumento del número de células inflamatorias en la mucosa y en el compartimento sistémico, especialmente en aquellos colonizados por bacterias gram-negativas, y también con una mayor gravedad clínica. **(B)** La identificación bacteriana se realizó por cultivo bacteriano convencional, no por PCR, lo que podría haber disminuido la posibilidad de identificar bacterias potencialmente patógenas así como de medir la densidad de las mismas. Sin embargo, numerosos autores han utilizado los cultivos convencionales para estudiar las poblaciones bacterianas de la nasofaringe,<sup>13,17,98,268,281,408</sup> algunos con un rendimiento cercano al 100%.<sup>281</sup> Además, las técnicas de secuenciación actuales no distinguen entre bacterias vivas o muertas, lo que también podría introducir un sesgo.<sup>409</sup> A este respecto, la identificación mediante cultivo convencional es valiosa porque implica que el paciente tiene una concentración de microorganismos suficientemente alta como para poder detectarse y/o sugiere que existe replicación activa.<sup>13,213</sup> Además, aunque la microbiota de la nasofaringe es muy rica y variada y existen bacterias que no crecen en los cultivos convencionales,<sup>13</sup> nuestros análisis incluyeron las 4 bacterias patógenas que se consideran más importantes en las infecciones respiratorias de la infancia. **(C)** Otra limitación de nuestro estudio es que no hemos podido establecer una relación entre la detección de bacterias en el tracto respiratorio superior y el tracto respiratorio inferior, ya que sólo seis pacientes precisaron intubación. Aunque el aislamiento de una bacteria potencialmente patógena en el tracto respiratorio superior no indica que esa misma bacteria se encuentre en el tracto respiratorio inferior,<sup>18</sup> varios estudios han demostrado que existe una alta concordancia genotípica de las cepas aisladas en la nasofaringe (mediante lavado nasal o frotis nasofaríngeo) en comparación con aquellas aisladas en el lavado broncoalveolar o esputo.<sup>214,410,411</sup> En nuestro estudio, además, encontramos datos indirectos tales como el aumento de marcadores

inflamatorios y patrones radiológicos anormales, los cuales sugieren que la presencia de bacterias potencialmente patógenas en la nasofaringe es más que un fenómeno pasivo. **(D)** Por último, nuestro estudio analiza la colonización nasofaríngea en un momento determinado, la infección aguda por VRS, por lo que desconocemos si el VRS modificó la composición de las poblaciones bacterianas o si, por el contrario, dichas bacterias ya se encontraban previamente en la nasofaringe, pudiendo determinar una mayor predisposición a la infección por el VRS, aumentando su adhesión o modulando la respuesta inmune para favorecer la infección viral.<sup>409</sup> Numerosos estudios han señalado la capacidad de las bacterias presentes en el tracto respiratorio superior para predisponer a infecciones virales e infecciones respiratorias.<sup>13,23,208,275-277,409</sup> Por ello creemos que, para esclarecer la secuencia y significación de los eventos observados, serían necesarios estudios longitudinales, con toma de muestras en intervalos de tiempo durante los periodos de salud y enfermedad, además de la caracterización de los perfiles de la respuesta inmune del huésped en dichos hitos temporales.

A pesar de estas limitaciones, creemos que nuestro estudio constituye un primer paso para ayudar a entender la complejidad de las interacciones entre las bacterias potencialmente patógenas de la nasofaringe y el VRS en la población más relevante, el lactante pequeño con infección del tracto respiratorio inferior por VRS. Se necesitan estudios longitudinales, con un mayor número de lactantes y representativos del espectro de la enfermedad (casos extrahospitalarios, planta de hospitalización, UCIP) y que utilicen técnicas diagnósticas más sensibles (como la pirosecuenciación o la PCR) en combinación con perfiles de expresión génomica del huésped, para caracterizar en profundidad el papel de la colonización bacteriana nasofaríngea en la evolución clínica de la infección por VRS, lo que podría ayudar a identificar a los pacientes que necesitasen antibioterapia en este contexto y ayudaría al uso racional de antibióticos.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## **CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## 7.1. CONCLUSIONES

Del trabajo realizado y expuesto previamente se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- El uso de antibióticos fue frecuente en los lactantes hospitalizados con un primer episodio de bronquiolitis por VRS y se asoció con una menor probabilidad de recuperar bacterias potencialmente patógenas mediante los cultivos convencionales, además de que los pacientes tratados con antibióticos mostraron una mayor gravedad de la enfermedad, definida por parámetros clínicos y hallazgos radiológicos.
- 2.- Los lactantes hospitalizados con un primer episodio de bronquiolitis por VRS están colonizados por bacterias potencialmente patógenas con más frecuencia y con una mayor proporción de bacterias gram-negativas (*H. influenzae* no-tipificable y *M. catarrhalis*) que los controles sanos de edades similares, los cuales mostraban una mayor proporción de bacterias gram-positivas (*S. aureus*, *S. pneumoniae* y *Streptococcus* del grupo B).
- 3.- La colonización nasofaríngea por bacterias potencialmente patógenas en los lactantes hospitalizados con un primer episodio de bronquiolitis por VRS se asoció con un mayor porcentaje de neutrófilos en sangre periférica y un mayor número de leucocitos en el lavado nasal, especialmente en aquellos colonizados por bacterias gram-negativas.
- 4.- La colonización nasofaríngea por bacterias gram-negativas en los lactantes hospitalizados con un primer episodio de bronquiolitis por VRS se asoció a una mayor duración de oxígeno suplementario en comparación con la colonización por bacterias gram-positivas.
- 5.- Los lactantes infectados por el VRS colonizados por bacterias gram-negativas presentaron concentraciones aumentadas de IL-8 e IL-6 en plasma, lo que se correlacionó con mayores necesidades de oxígeno suplementario.

6.- La densidad bacteriana en la nasofaringe en lactantes con bronquiolitis por VRS se asoció proporcionalmente a las concentraciones plasmáticas de las citoquinas proinflamatorias IL-8 e IL-6, sugiriendo que la colonización bacteriana no es un fenómeno pasivo.

## **CAPÍTULO 8. APLICACIONES PRÁCTICAS**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

### 8.1. APLICACIONES PRÁCTICAS

Aunque se necesitan más estudios, con mayor número de pacientes y diferente diseño metodológico (longitudinales, con pacientes evaluados de forma ambulatoria, con herramientas diagnósticas más sensibles y técnicas que no sólo se centren en el estudio de los patógenos sino del huésped) para profundizar en el impacto de la colonización bacteriana en la infección por VRS, nuestro estudio sugiere que las bacterias potencialmente patógenas presentes en la nasofaringe en niños con bronquiolitis por VRS no son simples espectadores, y que probablemente interaccionan con el VRS añadiendo complejidad a la infección, modificando la respuesta inmunitaria y en última instancia pudiendo contribuir a la gravedad de la enfermedad.

En este contexto, pensamos que la importancia del estudio de la colonización bacteriana nasofaríngea radica en que ésta podría servir como un nuevo marcador que determine de forma precoz aquellos niños que están en riesgo de desarrollar complicaciones o una enfermedad más grave. Asimismo, es posible que la existencia de determinadas especies bacterianas en la nasofaringe, junto con el análisis de la respuesta inmunitaria que éstas producen en el huésped y los hallazgos clínicos, nos ayudara a extrapolar resultados sobre lo que ocurre en el tracto respiratorio inferior, permitiendo identificar con mayor precisión a los lactantes que presentan una coinfección virus-bacteria, lo que a su vez permitiría el uso racional y selectivo de los antibióticos, controlando a nivel global el desarrollo de resistencias antimicrobianas y mejorando, en última instancia, el manejo de estos pacientes.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## **CAPÍTULO 9. ANEXOS**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## ANEXO A. CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO

IRB #: «IRBNo»  
 Form Approval Date: «ApproveAt»  
 Study Approval Date: «ApproveDate»  
 Study Date of Expiration: «ExpireDate»



### CONSENT TO PARTICIPATE IN A CLINICAL RESEARCH STUDY

**STUDY TITLE:** Host Immune Responses to Microbial Pathogens

**PRINCIPAL INVESTIGATORS:** Asuncion Mejias, MD, Octavio Ramilo, MD

**CONTACT TELEPHONE NUMBER:** M-F 8:00am – 4:30pm: 614-722-4494

**STUDY SPONSORS:** Nationwide Children's Hospital, NIH, & Several Foundations

**SUBJECT'S NAME:** \_\_\_\_\_ **DATE OF BIRTH:** \_\_\_\_\_

**NOTE:** The words "you" and "your" are used in this consent form. These words refer to the study volunteer whether a child or an adult.

#### 1) INTRODUCTION

We invite you to be in this research study because you may have an infection that can be caused by a bacteria or a virus or disease that appears similar to an infection).

Participation is voluntary. Please learn enough about this research study, its risks and benefits, to decide whether you should agree to participate. We will explain the study to you, and give you a chance to ask questions about anything you do not understand. This process is called "informed consent". It is up to you to choose if you want to be in this study. You may refuse to be in this study or quit this study at any time, and standard medical care will still be available here or at a doctor of your choice without a penalty or loss of benefits to you.

Before agreeing to participate, it is important to read and understand the study information in this consent form. By signing the consent form, you agree to be in this study. Children 9 through 17 years of age must also agree to be in the study by signing the assent line of this form.

You will be given a signed and dated copy of the consent form.

#### 2) WHY ARE WE DOING THIS RESEARCH STUDY?

The purpose of this research study is to look at how the body responds to infection (immune response) caused by different types of microbes (bacteria and virus). Once a microbe enters the body, it stimulates the immune system (the system in the body that reacts to infection). We hope to find useful information from these blood tests to help doctors find the cause of illnesses in the future. This information could also help in the development of new ways of diagnosing, treating and preventing infections caused by microbes.

IRB #: «IRBNo»

Form Approval Date: «ApproveAt»

Study Approval Date: «ApproveDate»

Study Date of Expiration: «ExpireDate»



**3) WHERE WILL THE STUDY BE DONE AND HOW MANY SUBJECTS WILL TAKE PART?**

This study is being done at Nationwide Children's Hospital. This study is part of a group of studies looking how the body responds to infection. These studies will be done in the United States and other countries including Chile, Panama, Costa Rica, Spain, Italy and Finland. We hope to enroll about 500 subjects here at this hospital in this study.

**4) WHAT WILL HAPPEN DURING THE STUDY AND HOW LONG WILL IT LAST?**

We would like to collect information from your medical chart that is related to your infection.

About 1 teaspoon of blood will be collected for study purposes while you are in the hospital. Whenever possible, we will collect the blood when you are having blood drawn as part of your routine care. If this is not possible, blood may be collected by a placing a needle into a vein in your arm, finger poke or heel poke.

Most patients will have blood drawn only once. If you are still in the hospital, we may ask for follow-up blood samples at 48-72 hours after admission and 1 week later to monitor the course of the infection.

We may also collect a mucous sample by throat swab and/or nasal swab or wash to look for microbes and to look at the body's response to infections. A nasal wash is done by squirting about half a teaspoon of salt water into your nose and sucking it back out quickly. The nasal swab is done by rubbing the inside of the nose with a cotton swab. A throat swab is done by rubbing the back of the throat with a small cotton ball on the end of a stick. These samples will be collected 1 time.

Some patients with specific infections may be asked to have additional blood drawn to look for changes in the immune response. This blood would be drawn during your regularly scheduled follow-up visits related to your infection.

Sometimes, leftover blood, nasal and throat samples may be stored for research at a later time, perhaps even years from now. This research may include DNA (gene) testing. This future research may be for purposes other than your medical problem. You will not be told the results of any future research. These samples will be kept indefinitely and may be shared with other investigators at other institutions. These samples will not be labeled with your name or initials, only your study subject number. The only person who will be able to link you to your sample is your study doctor. If you decide at any time that you do not want your blood stored for future research, you may contact the Study Doctor or Study Nurse.

Please initial:

☐ I agree to allow leftover blood, nasal and throat samples to be stored for future research. I understand that they may be used for research unrelated to this study and that I will not be told the results.

☐ I do not want leftover blood, nasal and throat samples to be stored for future research.

Some new products might be developed and sold because of the research done on your blood, nasal or throat samples but you will not receive money for this.

IRB #: «IRBNo»

Form Approval Date: «ApproveAt»

Study Approval Date: «ApproveDate»

Study Date of Expiration: «ExpireDate»



**5) WHAT ARE THE RISKS OF BEING IN THIS STUDY?**

**Blood Draw**

Drawing blood and starting IVs by placing a needle in a vein may cause pain. Infection is a rare possibility. Numbing cream may be used on the skin to decrease the discomfort, if needed.

Although there are no known side effects from the numbing cream, skin irritation or an allergic reaction is possible.

**Throat and Nasal Swabs and Nasal Wash**

You may experience some discomfort during these procedures.

There may be other risks of being in this research study which are not known at this time.

**6) ARE THERE BENEFITS TO TAKING PART IN THIS STUDY?**

There will be no direct benefit to you from being in this study. The benefit for society is a better understanding of how the immune system responds to different infections, which may lead to new ways of diagnosing, treating and preventing infections.

**7) WILL THERE BE ANY COSTS TO ME?**

It will not cost you anything to be in this study. You will not be paid to be in this study.

**8) WHAT HAPPENS IF BEING IN THIS STUDY CAUSES INJURIES?**

If you are hurt by the procedures that are part of the study, you should seek medical treatment for the injuries and tell the study doctor as soon as possible at the number on the first page of this form.

In most cases, this care will be billed to your health insurance company or whoever usually pays for your health care at the usual charges, but some insurance companies will not pay for care related to a study. If the care is provided at Nationwide Children's Hospital, we make no commitment to pay for the medical care provided to you. No funds have been set aside to compensate you in the event of injury. If no one else pays for your care, you may have to pay for the cost of this care. This does not mean that you give up any of your legal rights to seek compensation for your injuries.

**9) WHAT HAPPENS IF I DO NOT FINISH THIS STUDY?**

It is your choice to be in this study or to stop at any time. If you decide to stop being in this study, it is OK, but you must call the study doctor or the study coordinator. If you stop being in the study, there will not be a penalty or loss of benefits to which you are otherwise entitled.

**10) HOW WILL MY STUDY INFORMATION BE KEPT PRIVATE?**

Information collected for this study will be kept confidential to the extent provided by law. Information used and/or disclosed (shared with someone outside of Nationwide Children's Hospital) may include information that can identify you. This is called "protected health information" or PHI. By agreeing to be in this study, you are giving permission or authorizing Dr. Ramilo and his study staff to collect, use, and disclose your PHI for this research study. Information collected is the property of Dr. Ramilo. In the event of any publication regarding this study, your identity will not be revealed.

If you have a bad outcome or adverse event from being in this study, the study staff or other health care providers may need to look at your entire medical records.

IRB #: «IRBNo»

Form Approval Date: «ApproveAt»

Study Approval Date: «ApproveDate»

Study Date of Expiration: «ExpireDate»



The PHI collected or created under this research study will be used/disclosed as needed until the end of the study. The records of this study will be kept for an indefinite period of time.

During participation in this research study, the study doctor and staff may review, collect, create, and use, personal health information, such as:

- Demographic Information (Names, Addresses, Telephone/Fax numbers, E-mail Addresses)
- Dates (such as admission/discharge, birth)

Demographic information such as name, address and birth date is collected for registration purposes, documentation of consent and to determine if you are eligible to be in the study.

Some of the people or companies that may be authorized to use, disclose, and receive PHI collected or created about you are:

- The study doctor and the study staff
- The sponsor (listed at the top of the page) and its representatives
- Representatives of the Food and Drug Administration (FDA), Office for Human Research Protections (OHRP), National Institute of Health (NIH), and other regulatory agencies within and outside the United States
- Members of Nationwide Children's Hospital Institutional Review Board (IRB), a committee that reviews all human subjects research for Nationwide Children's Hospital.
- Nationwide Children's Hospital internal auditors

Because of the need to give information to these people, absolute confidentiality cannot be guaranteed. Information given to these people may no longer be protected by federal privacy rules.

Every effort will be made to keep your protected health information (PHI) private. Your PHI will be removed or coded (de-identified) as much as possible to protect your privacy.

The PHI collected or created under this research study will be used/disclosed for the purpose of conducting this study and for all purposes necessary to conduct and ensure the integrity or effectiveness of the study. The records of this study will be kept for an indefinite period of time. This permission does not expire.

You may decide not to authorize the use and disclosure of your PHI, however, if it is required for this study, you will not be able to be in this study. If you agree to be in this study and later decide to withdraw, you may also withdraw your authorization to use your PHI. This request must be made in writing to the study doctor. Please address this request to:

Octavio Ramilo, MD  
Nationwide Children's Hospital  
700 Children's Drive  
Columbus, OH 43205

If you withdraw your authorization, no new PHI may be collected and the PHI already collected may not be used unless it has already been used or is needed to complete the study analysis and reports.

IRB #: «IRBNo»

Form Approval Date: «ApproveAt»

Study Approval Date: «ApproveDate»

Study Date of Expiration: «ExpireDate»



Dr. Ramilo and his colleagues keep a database of all subjects who participate in a research study. This database may be used to contact people about future studies. Only Dr. Ramilo and his colleagues have access to this database. The database will not be disclosed or sold to others outside Nationwide Children's Hospital.

Please initial:

\_\_\_\_\_ I want to be contacted about future research studies.

\_\_\_\_\_ I do not want to be contacted about future research studies.

**11) OTHER IMPORTANT INFORMATION**

The investigators are being paid by the funding agencies for the time and knowledge needed to do this study.

Being in more than one research study at the same time may cause injury. Please tell the Principal Investigator about being in any other research study so a decision can be made about being in more than one study at the same time

**12) WHOM SHOULD I CALL IF I HAVE QUESTIONS OR PROBLEMS?**

If you have questions about anything while on this study or you have been injured by the research, you may contact the study staff at 614-722-4494, Monday – Friday, between 8 AM to 4:30 PM.

If you have questions, concerns, or complaints about the research, questions about your rights as a research volunteer, cannot reach the Principal Investigator, or want to call someone else, please call (614) 722-2708, Nationwide Children's Hospital Institutional Review Board, (IRB, the committee that reviews all research in humans at Nationwide Children's Hospital).



IRB #: «IRBNo»

Form Approval Date: «ApproveAt»

Study Approval Date: «ApproveDate»

Study Date of Expiration: «ExpireDate»



**NATIONWIDE  
CHILDREN'S  
HOSPITAL<sup>SM</sup>**

**Subject's Name** \_\_\_\_\_ **Date of Birth** \_\_\_\_\_

**SUBJECT or SUBJECT'S PARENT OR PERSON AUTHORIZED TO CONSENT ON BEHALF OF  
THE CHILD (SUBJECT TO THE SUBJECT'S GENERAL MEDICAL CARE)**

I have read this consent form and have had a chance to ask questions about this research study. These questions have been answered to my satisfaction. If I have more questions about participation in this study or a research-related injury, I may contact the Principal Investigator. By signing this consent form, I certify that all health information I have given is true and correct to the best of my knowledge.

I have been given a copy of the Nationwide Children's Hospital Notice of Privacy Practices. I understand that my right to my patient information that is created or collected by Nationwide Children's Hospital in the course of this research can be temporarily suspended for as long as the research is in progress. I also understand that my right to access will be reinstated upon completion of this research.

I agree to participate in this study/I give permission for my child to participate in this study. I will be given a copy of this consent form with all the signatures for my own records.

**CONSENT SIGNATURES**

\_\_\_\_\_  
**ASSENT (if required)**

\_\_\_\_\_  
**DATE & TIME AM/PM**

\_\_\_\_\_  
**SUBJECT or SUBJECT'S LEGAL REPRESENTATIVE**

\_\_\_\_\_  
**DATE & TIME AM/PM**

\_\_\_\_\_  
**PERSON OBTAINING CONSENT**

I certify that I have explained the research, its purposes, and the procedures to the subject or subject's legal representative before requesting their signature.

\_\_\_\_\_  
**DATE & TIME AM/PM**

01/20/10

Page 6 of 6

Initials \_\_\_\_\_



## ANEXO B. AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA

Tuesday, March 23, 2010 1:53 PM

**Subject: IRB: Study Approved****Date:** Tuesday, January 26, 2010 10:49 AM**From:** eIRB@ccri.net**Reply-To:** <eIRB@ccri.net>**To:** Ramilo, Octavio octavio.ramilo@nationwidechildrens.org**Conversation:** Study Approved

January 26, 2010

Octavio Ramilo  
Infectious Diseases**Study ID:** IRB10-00028**Study Name:** Host Immune Responses to Microbial Pathogens

Dear Dr. Ramilo,

Your application for the above study has been reviewed and approved by Institutional Review Board Expedited Committee on 1/26/2010. The IRB assigned a Risk Level of Level 1 - no greater than minimal risk (45 CFR 46.404; 21 CFR 50.51). The IRB Expedited Committee was able to provide expedited approval because this study presents minimal risk to subjects, and because it fits into Categories 2,3 and 5 of the list of research types that may qualify for expedited review.

**Date of Approval:** 1/26/2010**Date of Expiration:** 1/25/2011

**This approval is for one year only.** A Continuing Review Report must be approved before this study can proceed beyond the date of expiration. Please be aware that all modifications to the research protocol consent form, or any other aspect of this study must receive prospective IRB approval. IRB policy requires that provisions are made for assent of subjects age nine and older.

**The Federalwide Assurance number assigned to the IRB at Nationwide Children's Hospital, Inc. is FWA00002860.**

If we can provide additional assistance, please do not hesitate to call this office at ext. 22708.

Sincerely,

Alexander Rakowsky, MD, Chair  
Institutional Review Board

## ANEXO C. COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

- **MC Suárez-Arrabal**, C Mella, S López, G Arthur, P Davies, C Burch, M Marcon, O Ramilo and A Mejias. Nasopharyngeal Colonization with Pathogenic Bacteria is Associated with Increase Disease Severity in non-PICU Children with RSV Bronchiolitis. Presentado como póster en el 49th Infectious Diseases Society of America (IDSA) Annual Meeting. Boston, Massachusetts, EEUU. 20-23 octubre 2011.
- **MC Suárez-Arrabal**, N Arradaza, S Lopez, G Arthur, C Burch, S Hammond, M Marcon, O Ramilo, A Mejias. Nasopharyngeal (NP) Colonization with Pathogenic Bacteria (PB) is Associated with Increased Disease Severity in Children with RSV Bronchiolitis. Presentado como comunicación oral en el 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID). Thessaloniki, Grecia. 8-12 de mayo de 2012.
- **MC Suárez-Arrabal**, N Arradaza, S López, G Arthur, O Ramilo y A Mejías. La colonización nasofaríngea por bacterias patógenas es frecuente en pacientes con bronquiolitis por virus respiratorio sincitial y está asociada a una mayor gravedad clínica. Presentado como comunicación oral en el 62º Congreso Nacional de la Asociación Española de Pediatría (AEP). Sevilla, 6-8 junio 2013.

## - IDSA Annual Meeting, Boston 2011



### 1226. Nasopharyngeal (NP) Colonization with Pathogenic Bacteria is Associated With Increased Disease Severity in Non-PICU Children with RSV Bronchiolitis

• **Session:** Poster Abstract Session: RSV and Other Viral Respiratory Infections in Children  
**Saturday, October 22, 2011**  
**Room:** Poster Hall B1

**Background:** Studies have shown that RSV enhances bacterial adhesion to the respiratory epithelium resulting in greater bacterial recovery. In the clinical context however, it is not known the impact of NP bacterial colonization on RSV disease. We sought to assess the frequency of pathogenic bacterial colonization in children with RSV bronchiolitis and, to determine whether bacterial colonization is associated with increased disease severity.

**Methods:** Previously healthy children < 2 yrs admitted to the Infectious Diseases or the Pediatric Intensive Care Unit (IDU or PICU) with a first episode of RSV bronchiolitis were enrolled from 12/2010 to 3/2011. NP bacterial swabs were collected within 24h of admission and cultured for the presence of *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *H. influenzae*, *S. pyogenes* and *S. agalactiae*. Demographic, clinical, laboratory, microbiologic and radiologic data were compared between patients who tested positive (RSV+<sub>b+</sub>) or negative (RSV+<sub>b-</sub>) for bacteria. Disease severity was assessed using a clinical disease severity score [CDSS], length of stay [LOS], and need and length of supplemental O<sub>2</sub>.

**Results:** A total of 132 children (60% males; median age 2.5 [1.5-4.4] months) were enrolled (IDU, n=100; PICU, n=32). Bacterial NP swabs were positive in 74/132 (56%) children. Of those with negative culture, 44/58 (76%) had received antibiotics (IDU 41% vs PICU 72%). In both units the most frequent bacteria identified were *S. aureus* (26%), *S. pneumoniae* (15%) and *M. catarrhalis* (13%). RSV+<sub>b-</sub> vs RSV+<sub>b+</sub> children admitted to the IDU had a greater proportion of normal chest-x rays (19% vs 4%; p=0.04) and lower CDSS [6 (4.5-7) vs 7 (5-9); p=0.01]. Adjusting for antibiotic use the % of blood neutrophils (27.4 ±10.9 vs 17.9 ±8.2; p=0.02) was higher in the RSV+<sub>b+</sub> vs RSV+<sub>b-</sub> group independent of the admission unit. There were no differences in LOS or need for supplemental O<sub>2</sub> between groups.

**Conclusion:** NP colonization with pathogenic bacteria is common in children with RSV bronchiolitis. Non-PICU children with a bacterial pathogen identified showed increased disease severity as defined by the CDSS and chest-x ray abnormalities. Further studies are needed to elucidate the clinical significance and mechanisms of RSV-bacterial interactions.

• **Subject Category:** P. Pediatric and perinatal infections

**María del Carmen Suárez-Arrabal, MD<sup>1</sup>**, Cesar Mella, MD<sup>2</sup>, Santiago M.C. López, MD<sup>1</sup>, Gail Arthur<sup>3</sup>, Paula Davies<sup>3</sup>, Cynthia Burch<sup>4</sup>, Mario Marcon, PhD<sup>4</sup>, Octavio Ramilo, MD<sup>1</sup> and Asuncion Mejias, MD, PhD<sup>1</sup>, (1)Center for Vaccines and Immunity, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, Columbus, OH, (2)Division of Critical Care Medicine, Nationwide Children's Hospital, Columbus, OH, (3)Department of Clinical Research, Nationwide Children's Hospital, Columbus, OH, (4)Department of Laboratory Medicine, Nationwide Children's Hospital, Columbus, OH

<https://idsa.confex.com/idsa/2011/webprogram/Paper31454.html>

- ESPID 30<sup>th</sup> Annual Meeting, Thessaloniki 2012

**NASOPHARYNGEAL (NP) COLONIZATION WITH PATHOGENIC BACTERIA (PB) IS ASSOCIATED WITH INCREASED DISEASE SEVERITY IN CHILDREN WITH RSV BRONCHIOLITIS**

M.C. Suarez Arrabal<sup>1</sup>, N. Arradaza<sup>2</sup>, S.M.C. Lopez<sup>1</sup>, G. Arthur<sup>3</sup>, C. Burch<sup>4</sup>, S. Hammond<sup>5</sup>, M. Marcon<sup>4</sup>, O. Ramilo<sup>1</sup>, A. Mejias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Vaccines and Immunity, The Research Institute, <sup>2</sup>Department of Statistics, The Ohio State University, <sup>3</sup>Department of Clinical Research, <sup>4</sup>Department of Laboratory Medicine, <sup>5</sup>Department of Pathology, Nationwide Children's Hospital, Columbus, OH, USA

**Background:** The impact of NP bacterial colonization on RSV disease has not been characterized. We evaluated the frequency of pathogenic bacteria (PB) colonization in children with RSV bronchiolitis, and determined its association with disease severity.

**Methods:** Previously healthy children < 2yrs hospitalized with a first episode of RSV bronchiolitis and healthy controls were enrolled. NP bacterial swabs collected within 24h of admission were cultured for: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *H. influenzae*, and  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus*. Demographic, clinical, laboratory and disease severity parameters were compared between patients who tested positive or negative for PB.

**Results:** From 12/2010 to 9/2011, 136 children with RSV bronchiolitis (62% males; 2.53 [1.5-4.4] months) and 23 matched controls were enrolled. NP cultures were negative for PB in 43% (59/136) of RSV children and among those 76% had received antibiotics. Patients not treated with antibiotics (69/136; 51%) were colonized more frequently with Gram-negative bacteria (GNB, 43%; 15/35) whereas healthy controls were mostly colonized with Gram-positive bacteria (GPB, 93%; 13/14)(p=0.01). RSV patients colonized with PB had higher WBCs in NP samples (p=0.03), higher blood neutrophil% (p=0.02) and lower basal O2 sats (p< 0.05) than those not colonized with PB. Moreover, colonization with GNB, but not GPB, was associated with longer needs for O2 (p=0.04).

**Conclusions:** Infants with RSV colonized with PB showed a clear trend for increased disease severity, especially those colonized by GNB that required O2 for longer periods of time. Further studies are needed to elucidate the clinical significance and mechanisms of RSV-bacterial interactions.

## - 62º Congreso Nacional de la AEP, Sevilla 2013

AEP 2013-62 Congreso de la Asociación Española de Pediatría

## Comunicaciones orales

**Conclusiones:** La tasa de gestantes latinoamericanas con diagnóstico de EC en nuestra área de referencia ha sido mayor a otras series publicadas, quizá por el mayor número de población procedente de áreas endémicas, sin embargo, la tasa de transmisión vertical es similar al resto. El caso índice puede llevarnos al diagnóstico del recién nacido y de sus hermanos, lo que supone un beneficio añadido al screening. No obstante, la falta de inclusión de gestantes de otras áreas de la provincia y las frecuentes pérdidas durante el seguimiento supone una importante limitación del estudio.

## C132

**Indicaciones del tratamiento con oseltamivir en niños hospitalizados por gripe sin patología de base, ¿es siempre necesario?**

Cristina Calvo, Diana Mazagatos, Ana Méndez, Luis Escosa, Mar Santos, Jaime Carrasco  
Hospital Universitario Severo Ochoa, Fundación Hospital Alcorcón, Hospital General Universitario La Paz, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid

**Introducción y objetivos:** Analizar si el tratamiento con oseltamivir en niño hospitalizados con gripe confirmada, sin enfermedades de base mejora la evolución y el pronóstico de la enfermedad.

**Pacientes y métodos:** Estudio multicéntrico retrospectivo realizado en Madrid, entre septiembre de 2010 y junio de 2012 en 10 hospitales de la red pública que atienden al 56% de la población de la comunidad. Se incluyeron niños con infección confirmada por influenza, mediante test rápido o reacción en cadena de polimerasa. Se excluyeron del estudio los niños con patología de base (excepto el asma), las infecciones nosocomiales y los niños que hubieran sido tratados con oseltamivir previo al ingreso o los tratados después de las 48 horas del ingreso. Se compararon los pacientes que recibieron o no tratamiento con oseltamivir durante la hospitalización (el criterio de tratamiento fue variable entre hospitales, algunos de los cuales trataron a todos los pacientes y otros solo a los niños con factores de riesgo o patología de base). Se compararon la duración de la fiebre, la necesidad de oxígeno, la administración de antibióticos, la duración de la hospitalización, la necesidad de ingreso en cuidados intensivos, así como las complicaciones bacterianas.

**Resultados:** Se incluyeron 287 niños de los cuales 93 (32%) recibieron tratamiento con oseltamivir. No hemos encontrado diferencias en la duración de la fiebre, de la hospitalización, la necesidad de ingreso en cuidados intensivos, la necesidad de oxigenoterapia o las complicaciones bacterianas entre ambos grupos (tabla 1). Los niños con asma no presentaron diferencias entre ambos grupos.

**Tabla 1.** Características clínicas de los niños tratados y no tratados con oseltamivir

	Tratados (n=93)	No tratados (n=194)	p
Historia de asma	34 (36.6%)	49(25.5%)	NS
Tratamiento anti-biótico	41 (44%)	98(51%)	NS
Duración del ingreso	4.7 ± 3.6	4.9 ± 3.2	NS
Duración de la fiebre	1.2 ± 2	1.6 ± 2.4	NS
Duración de la hipoxia	1.6 ± 2.3	2.1 ± 2.9	NS
Ingreso intensivos	6(6.5%)	3 (1.6%)	NS
PCR > 60 mg/l	10/69 (14.5%)	21/113 (18.1%)	NS
Neumonía típica	5/45 (10%)	13/76 (17%)	NS

PCR: proteína C reactiva, NS: no significativo.

**Conclusiones:** No hemos encontrado beneficios en el tratamiento con oseltamivir en niños hospitalizados sin patología de base, ni en la duración del ingreso, ni en las complicaciones bacterianas o uso de antibióticos.

## C133

**La colonización nasofaríngea por bacterias patógenas es frecuente en pacientes con bronquiolitis por virus respiratorio sincitial y está asociada a una mayor gravedad clínica**

M.ª del Carmen Suárez-Arrabal, Nicole Arradaza, Santiago López, Gail Arthur, Octavio Ramilo, Asunción Mejías  
Center for Vaccines and Immunity, The Research Institute, Nationwide Children's Hospital, The Ohio State University, Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio, EE. UU.

**Antecedentes:** El VRS es la causa más importante de bronquiolitis en lactantes y niños pequeños. Estudios *in vitro* han demostrado que el VRS favorece la adhesión y replicación bacteriana en el epitelio respiratorio. Sin embargo, en el contexto clínico se desconoce el impacto de la colonización bacteriana en la bronquiolitis por VRS. El objetivo de este estudio fue evaluar la frecuencia de colonización nasofaríngea por bacterias patógenas (BP) en niños con bronquiolitis por VRS y determinar si dicha colonización se asocia con un aumento de la gravedad clínica.

**Métodos:** Se realizó un estudio prospectivo en el que se reclutaron niños previamente sanos <2 años ingresados con un primer episodio de bronquiolitis por VRS. Se recogieron frotis nasofaríngeos (FN) en las primeras 24h del ingreso y se cultivaron en medios específicos para *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *H. influenzae* no tipable y *Streptococcus* -hemolítico. Posteriormente, se compararon los datos demográficos, clínicos, de laboratorio y de gravedad de la enfermedad entre los pacientes con FN positivo o negativo para crecimiento de BP.

## Comunicaciones orales

AEP 2013-62 Congreso de la Asociación Española de Pediatría

**Resultados:** De diciembre de 2010 a septiembre de 2011 se reclutaron 136 niños con bronquiolitis por VRS (62% varones; 2,53 meses [1,5-4,4]) y 23 controles sanos. Un 43% (59/136) de los niños con VRS presentaron un FN negativo para BP, y el 76% de ellos había recibido antibióticos previamente. Las bacterias que se identificaron más frecuentemente fueron *S. aureus* (30%), *M. catarrhalis* (24%) y *S. pneumoniae* (22%). Los pacientes no tratados con antibióticos (72/136; 53%) estaban colonizados con mayor frecuencia por bacterias Gram-negativas (BGN, el 43%; 15/35), mientras que los controles sanos estaban colonizados principalmente por bacterias Gram-positivas (BGP, 93%; 13/14) ( $p=0,01$ ). La presencia de BP independientemente del tipo se asocia con un mayor número de leucocitos en el FN ( $p=0,02$ ) y mayor

porcentaje de neutrófilos en sangre ( $p=0,02$ ) que los que no colonizados con BP. Sin embargo, la colonización por BGN, pero no por BGP, se asoció con necesidades de oxígeno durante más tiempo ( $p=0,04$ ).

**Conclusiones:** La colonización por BP es frecuente en lactantes con bronquiolitis por VRS y diferente a la encontrada en controles sanos. La identificación nasofaríngea de PB se asoció a un incremento de células blancas a nivel de la mucosa y sistémico. Además, la colonización por BGN se asoció a empeoramiento de los parámetros clínicos de gravedad. Es preciso realizar nuevos estudios para comprender el significado clínico y los mecanismos implicados en las interacciones VRS-bacterias en la nasofaringe.




## ANEXO D. ARTÍCULOS PUBLICADOS


- **Suárez-Arrabal MC**, Mella C, Lopez SM, Brown NV, Hall MW, Hammond S, et al. Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Journal of Infection*. 2015;71(4):458-69.

ARTICLE IN PRESS

Journal of Infection (2015) xx, 1–12



**ELSEVIER**



British Infection Association

[www.elsevierhealth.com/journals/jinf](http://www.elsevierhealth.com/journals/jinf)

## Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis<sup>☆</sup>

M. Carmen Suárez-Arrabal<sup>a,i</sup>, Cesar Mella<sup>a,b,j</sup>,  
Santiago M. Lopez<sup>a</sup>, Nicole V. Brown<sup>c</sup>, Mark W. Hall<sup>b</sup>,  
Sue Hammond<sup>d</sup>, William Shiels<sup>e</sup>, Judith Groner<sup>f</sup>,  
Mario Marcon<sup>g</sup>, Octavio Ramilo<sup>a,h</sup>, Asuncion Mejias<sup>a,h,\*</sup>

<sup>a</sup>Center for Vaccines and Immunity, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, Columbus, OH, USA  
<sup>b</sup>Division of Critical Care Medicine, Nationwide Children's Hospital and The Ohio State University School of Medicine, Columbus, OH, USA  
<sup>c</sup>Center for Biostatistics, The Ohio State University, Columbus, OH, USA  
<sup>d</sup>Department of Pathology, Nationwide Children's Hospital and The Ohio State University School of Medicine, Columbus, OH, USA  
<sup>e</sup>Department of Radiology, Nationwide Children's Hospital and The Ohio State University School of Medicine, Columbus, OH, USA  
<sup>f</sup>Section of Ambulatory Pediatrics, Nationwide Children's Hospital and The Ohio State University School of Medicine, Columbus, OH, USA  
<sup>g</sup>Department of Microbiology and Laboratory Medicine, Nationwide Children's Hospital and The Ohio State University School of Medicine, Columbus, OH, USA  
<sup>h</sup>Division of Infectious Diseases, Nationwide Children's Hospital and The Ohio State University School of Medicine, Columbus, OH, USA

Accepted 27 June 2015  
Available online ■ ■ ■

<sup>☆</sup> This work was presented in part at the European Society for Pediatric Infectious Diseases 30th Annual Meeting. Thessaloniki, Greece, May 8–12, 2012.

\* Corresponding author. Division of Pediatric Infectious Disease, Center for Vaccines and Immunity, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, The Ohio State University College of Medicine, 700 Children's Drive, WA 4022, Columbus, OH 43205, USA. Tel.: +1 614 355 2949; fax: +1 614 722 3680.

E-mail addresses: [mcarmen1981@yahoo.com](mailto:mcarmen1981@yahoo.com) (M.C. Suárez-Arrabal), [cfmella@texaschildrens.org](mailto:cfmella@texaschildrens.org) (C. Mella), [Asuncion.Mejias@nationwidechildrens.org](mailto:Asuncion.Mejias@nationwidechildrens.org) (A. Mejias).

<sup>†</sup> Present address: Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain.

<sup>‡</sup> Present address: Section of Pediatric Critical Care, Baylor College of Medicine, 6621 Fannin St, W6006/Houston, TX 77030, USA.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>  
0163-4453/© 2015 The British Infection Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Suárez-Arrabal MC, et al., Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis, *J Infect* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>

**KEYWORDS**

Nasopharyngeal  
bacterial colonization;  
Bronchiolitis;  
RSV;  
Disease severity;  
Gram-negative  
bacteria;  
Antibiotics

**Summary Objectives:** Animal studies suggest that RSV increases nasopharyngeal (NP) bacterial colonization facilitating bacterial infections. We investigated the influence of antibiotic treatment and colonization with potentially pathogenic bacteria on inflammatory markers and disease severity in RSV-infected infants.

**Methods:** Healthy young infants hospitalized with RSV bronchiolitis ( $n = 136$ ) and age-matched healthy controls ( $n = 23$ ) were enrolled and NP samples cultured for potentially pathogenic bacteria including: Gram-positive bacteria (GPB): *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*,  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus*; and Gram-negative bacteria (GNB): *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae*. Clinical parameters and plasma IL-8, IL-6 and TNF- $\alpha$  concentrations were compared according to the bacterial class and antibiotic treatment.

**Results:** Antibiotic treatment decreased by 10-fold NP bacterial recovery. Eighty-one percent of RSV infants who did not receive antibiotics before sample collection were colonized with pathogenic bacteria. Overall, GNB were identified in 21% of patients versus 4% of controls who were mostly colonized with GPB. Additionally, in RSV patients NP white blood cell counts ( $p = 0.026$ ), and blood neutrophils ( $p = 0.02$ ) were higher in those colonized with potentially pathogenic bacteria versus respiratory flora. RSV patients colonized with GNB had higher plasma IL-8 ( $p = 0.01$ ) and IL-6 ( $p < 0.01$ ) concentrations than controls, and required longer duration of oxygen ( $p = 0.049$ ).

**Conclusions:** Infants with RSV bronchiolitis colonized with potentially pathogenic bacteria had increased numbers of mucosal and systemic inflammatory cells. Specifically, colonization with GNB was associated with higher concentrations of proinflammatory cytokines and a trend towards increased disease severity.

© 2015 The British Infection Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Introduction**

Respiratory syncytial virus (RSV) lower respiratory tract infections (LRTI) represent the leading cause of hospitalization in infants worldwide.<sup>1,2</sup> Epidemiologic studies have identified children at high risk for severe RSV disease and mortality.<sup>3–6</sup> Nevertheless, the majority of infants hospitalized with RSV LRTI are previously healthy with no known risk factors.<sup>7,8</sup> Of those, up to 15% require pediatric intensive care unit (PICU) treatment.<sup>9</sup>

A broad variety of bacteria colonize the children's nasopharynx, including commensal bacteria and potential pathogens such as *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, non-typable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*.<sup>10–12</sup> These potentially pathogenic bacteria usually colonize the nasopharynx without causing symptoms, however when the balance between the host and the pathogen is disrupted clinical disease may occur. Studies *in vitro* and in animal models suggest that respiratory viral infections, and specifically RSV, increase nasopharyngeal (NP) bacterial colonization promoting bacterial infections.<sup>11,13,14</sup> The information in infants is limited. Epidemiologic studies have shown a temporal association between RSV infections and invasive pneumococcal disease.<sup>15–20</sup> In addition, studies mostly performed in older children with viral-induced wheezing or pneumonia suggest that colonization with pathogenic bacteria increases disease severity.<sup>15,21–23</sup> The potential role of NP colonization with PPB in modifying the severity of RSV LRTI remains to be defined. Although, antibiotics are not routinely recommended for the treatment of bronchiolitis, they are commonly used, likely reflecting physician concerns of an undetected bacterial infection in young infants.<sup>24</sup> Whether antibiotic treatment impacts NP bacterial colonization, and

whether infants with RSV LRTI receiving antibiotics represent a different subset of infants with enhanced disease severity has not been well characterized. The objectives of this study were: 1) to determine the frequency and type of NP colonization with potentially pathogenic bacteria in healthy infants hospitalized with RSV LRTI, and 2) to assess the impact of bacterial colonization on inflammatory cells in both the upper respiratory tract and blood; on plasma inflammatory cytokines; and on clinical disease severity after adjusting for antibiotic use.

**Subjects, materials, and methods****Study design**

This was a prospective, observational cohort study conducted in otherwise healthy infants hospitalized with a first episode of RSV bronchiolitis and a group of healthy age-matched controls during the 2010–11 RSV season. Patients were excluded if they were premature (gestational age  $< 35$  weeks), had chronic medical conditions, were diagnosed with other respiratory viral infections (i.e. parainfluenza virus, human metapneumovirus), immunodeficiency, or had received systemic steroids or any immunomodulatory drugs within 2 weeks of hospitalization (Fig. 1). Monday through Friday infants hospitalized with bronchiolitis were identified using the hospital census. Those who had a confirmatory RSV test (58% by direct fluorescence antibody testing (DFA); 36% by RSV rapid antigen test and 2% by a PCR panel) or had a clinical picture compatible with bronchiolitis in the peak of the RSV season and were subsequently confirmed by RSV PCR (4%) were enrolled on days 1 to 3 of hospitalization (median 24 h) when fulfilling the study criteria. Healthy controls were enrolled in the

Please cite this article in press as: Suárez-Arrabal MC, et al., Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis, J Infect (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>



## ARTICLE IN PRESS

RSV Bronchiolitis and NP bacterial colonization

3

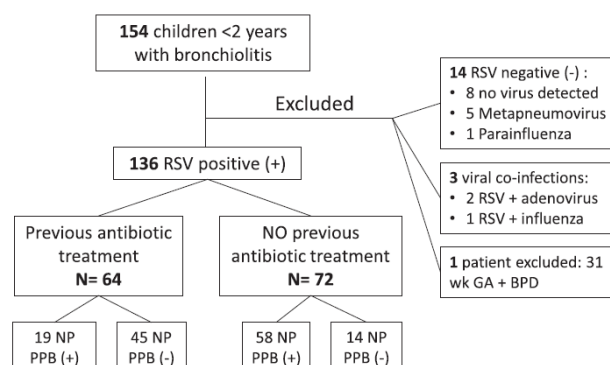


Figure 1 Flow diagram of study patient selection. From December 2010 to July 2011 we enrolled 154 children <2 years of age hospitalized with bronchiolitis and 23 healthy age matched controls (not shown). 14 patients were excluded for different reasons as outlined. Only 136 children with confirmed RSV LTRI were considered for subsequent analyses. GA: gestational age, BPD: bronchopulmonary dysplasia, NP: nasopharyngeal, PPB: potential pathogenic bacteria.

operating room for scheduled surgical procedures not involving the respiratory tract (i.e. hernias) or at primary care offices. Exclusion criteria for healthy controls included history of respiratory tract illnesses or use of antibiotics within 2 weeks of enrollment. In patients and controls we obtained a bacterial NP swab, a nasal wash (NW) and a blood sample as described below. RSV infection was confirmed by real time PCR in all subjects.<sup>9,25</sup> The Institutional Review Board at Nationwide Children's Hospital (IRB; #10-00028) approved the study and written informed consent was obtained from guardians before participation in the study.

#### Data collection

The following data were collected using a clinical questionnaire at the time of enrollment and by chart review: 1) *Demographic, epidemiologic characteristics* including vaccination status and antibiotic treatment, defined by at least one dose of antibiotics administered within 1 week of sample collection, breastfeeding at the time of enrollment, smoke exposure, and day care attendance and/or contact with  $\geq 1$  school age siblings; 2) *Microbiology and laboratory parameters*: blood and urine cultures and white blood cell (WBC) counts with differential; 3) *Chest-X ray findings* which were independently reviewed by a radiologist blinded to the study and were grouped into: (a) no pathologic findings, (b) bronchial wall thickening and/or hyperinflation, (c) interstitial markings and/or atelectasis and (d) lobar consolidation; 4) *Disease severity* was evaluated by measuring: duration and presence of fever, defined as the highest axillary temperature  $\geq 38^\circ\text{C}$  since the beginning of the illness and until discharge; length of hospital stay, need and duration of supplemental oxygen, need and duration of PICU treatment, and need and duration of invasive or non-invasive ventilatory support. In addition, we used a standardized clinical disease severity score (CDSS) composed of 5 parameters individually ranked

from 0 (normal) to 3 (severe) and classified patients as mild (0–5), moderate (6–10) or severe (11–15) disease (Table S1).<sup>9,26,27</sup> At our institution we follow a rigorous clinical pathway for administration and discontinuation of supplemental O<sub>2</sub>, as every 2 h O<sub>2</sub> needs are reassessed, and for discharge criteria which includes: (a) ability to maintain O<sub>2</sub> sats  $>90\%$  at room air for at least 6–12 h in uncomplicated patients, (b) lack of fever for at least 12 h, (c) respiratory rate below the threshold for tachypnea based on the World Health Organization (WHO) definitions, and (d) adequate oral intake.

#### Sample collection

A NP swab followed by a NW sample were performed in all study subjects following established methods.<sup>28–31</sup> (A) NP swabs were collected using a flexible mini-tipped, nylon flocked swab (ESwab® 482C, Copan Diagnostics, Inc.), placed into modified liquid Amies medium, transported at room temperature within  $3 \pm 1$  h of collection and specifically processed for the identification of potential pathogens as detailed below. Several prepared enriched media (BD Diagnostic System®) for bacterial growth were specifically used for the study, including trypticase soy agar with 5% sheep blood (TSA II) for *S. pneumoniae*, *S. aureus* and  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus* [*Streptococcus pyogenes* (GAS), *Streptococcus agalactiae* (GBS)]; chocolate agar with hemoglobin and isovitalax for *M. catarrhalis*, *H. influenzae* and *Neisseria meningitidis*. Isolation agar with bacitracin was used for *H. influenzae* and Thayer Martin modified (MTM II) for *N. meningitidis*. Petri dishes were placed in a CO<sub>2</sub> incubator at  $35^\circ\text{C}$  for three days. In addition, samples were cultured in CDC anaerobe 5% sheep blood agar for enhanced detection of *S. pneumoniae*, *S. aureus* and  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus* and placed in an anaerobic chamber for 5 days. Semiquantitative bacterial loads were quantified based on growth in the four-quadrant streak plate, which establishes four categories:

Please cite this article in press as: Suárez-Arrabal MC, et al., Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis, J Infect (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>

## ARTICLE IN PRESS

4

M.C. Suárez-Arrabal et al.

rare [ $<10$  colonies/plate in the 1st quadrant]; few [ $>10$  colonies/plate in the 1st quadrant]; moderate [growth in the 1st and 2nd quadrants]; and many [growth in the 1st through the 3rd quadrant or greater].<sup>32</sup> (B) NW samples were obtained and transported immediately to the laboratory on ice.<sup>29,31</sup> After centrifugation, supernatant was resuspended in trizol and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for RSV real time PCR testing.<sup>9,25</sup> The pellet was processed to single cell suspensions and cell counts determined using a Neubauer hemocytometer. Cytospin slides were prepared with 50,000 cells and stained with Wright-Giemsa for further WBC and differential counts. (C) Blood was collected in a subset of patients into heparinized tubes (Vacutainer™, BD, Franklin Lakes, NJ) and centrifuged for 5 min at 3000 rpm within one hour of collection. Plasma was then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent measurement of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6 and IL-8 concentrations using the Immulite automated chemiluminometer (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Deerfield, IL).<sup>9,33</sup> The lower limit of detection was 5 pg/mL for TNF- $\alpha$  and IL-8, and 2 pg/mL for IL-6. All samples were run in duplicate.

## Statistical analyses

Patient demographic and baseline characteristics are reported using descriptive statistics. Continuous variables are presented as median (25th percentiles – 75th percentiles) and categorical variables as frequency (percentage). Associations between categorical variables were determined

using the Chi-square or the Fisher's exact tests where appropriate. For continuous outcomes, one-way analysis of variance or Kruskal–Wallis test adjusted for multiple comparisons (Dunn's test) were performed according to data distribution. A two sided p-value  $< 0.05$  was considered significant. Analyses were run in SigmaPlot 11.0 (Systas Software, Inc.) or SAS software, Version 9.2.

## Results

## Study subjects

From December 2010 to July 2011, 154 children with bronchiolitis and 23 healthy controls were enrolled. RSV patients were enrolled from December to April, and controls from the beginning of March to July, 70% of them while there was RSV activity. Eighteen patients were excluded from the analyses for the reasons outlined in Fig. 1. Of the 136 infants with RSV LRTI, 104 were enrolled in the ward and 32 in the PICU at 24 h (1–3 days) of hospitalization. There were 84 (62%) males; and the median [IQR] age was 2.5 [1.5–4.4] months. There were no significant differences in demographic characteristics or vaccination status between RSV patients and controls; however the predominant race among healthy controls was African American. As expected, WBC counts and differential were significantly different between patients and controls (Table 1).

Table 1 Demographic and laboratory parameters in infants with RSV and healthy controls.

	Controls (n = 23)	RSV patients (n = 136)	P value
<b>Demographic characteristics</b>			
Age (months)	3.2 [1.6–8.2]	2.5 [1.5–4.4]	0.136
Gender [n (%)]			0.819
Male	15 (65)	84 (62)	
Female	8 (35)	52 (38)	
Gestational age (weeks)	39 [38–40]	40 [38–40]	0.514
Race/Ethnicity [n (%)]			0.007
White	10 (43.5)	98 (72)	
Black	10 (43.5)	21 (15)	
Other	3 (13)	17 (13)	
Breastfeeding	5/20 (25)	36/133 (27)	0.845
Vaccination status [n (%)]			0.552
Up-to date	20 (87)	115 (85)	
Incomplete	1 (4)	14 (10)	
Unknown	2 (9)	7 (5)	
Smoke exposure	6/15 (40)	49/100 (49)	0.582
Day care attendance or school age siblings	11/17 (65)	107/132 (81)	0.124
<b>Laboratory characteristics</b>			
WBC/mm <sup>3</sup>	7.8 [7.4–9.4]	11.3 [8.8–13.4]	0.004
Neutrophils %	17.0 [12.0–22.0]	27.0 [17.0–35.0]	0.023
Lymphocytes %	73.0 [62.0–77.0]	52.5 [42.5–62.0]	$<0.001$
Monocytes %	9.0 [5.0–11.0]	11.0 [8.0–15.5]	0.046
Eosinophils %	3.0 [2.0–4.0]	0.0 [0.0–1.5]	$<0.001$

WBC: white blood cell counts. Data is expressed as median values [interquartile ranges 25%–75%]. Numbers in parenthesis represent the percentage of subjects in each group. Mann–Whitney Rank Sum test was used for continuous variables and Chi-square test for analyses of categorical data. For the demographic variables breastfeeding, smoke exposure and day care attendance or exposure to school-age siblings the number of patients in whom that parameter was documented is included in the denominator.

Please cite this article in press as: Suárez-Arrabal MC, et al., Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis, J Infect (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>

## ARTICLE IN PRESS

RSV Bronchiolitis and NP bacterial colonization

5

**Antibiotic treatment significantly modifies nasopharyngeal colonization patterns**

Of all RSV + enrolled infants, 47% (64/136) received antibiotics before sample collection, especially in the PICU where antibiotic treatment was documented in 75% of infants. Antibiotics were administered in the majority of children at hospital admission and their administration continued in 66% of RSV + infants for more than 24 h for different reasons including: severe disease requiring PICU treatment, acute otitis media or suspected pneumonia.

Overall potentially pathogenic bacteria defined as *S. aureus*, *S. pneumoniae*,  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus*, non-typable *H. influenzae* or *M. catarrhalis* were cultured in the NP of 30% (19/64) of infants who received antibiotics compared with 81% (58/72) of infants who did not ( $p < 0.001$ ; Fig. 1). *N. meningitidis* was not cultured in any case. In fact, previous antibiotic treatment was associated with an almost 10-fold decreased risk of recovering pathogenic bacteria (OR 95% CI: 9.8 [4.4–21.6]). The

antibiotics most commonly used were betalactams, vancomycin, aminoglycosides and macrolides. To determine whether antibiotic treatment at the time of hospitalization reflected a more severe disease, we compared clinical and laboratory parameters between infants treated or not with antibiotics. Demographic and most clinical parameters were comparable between groups, including fever, need for oxygen, length of hospitalization and the clinical diseases severity score. However, infants treated with antibiotics required oxygen for a longer time, had blood WBC counts more commonly performed and radiographic lobar consolidation more frequently identified versus those not treated with antibiotics (Table 2).

**Nasopharyngeal bacterial colonization in RSV infants and healthy controls after adjusting for antibiotic treatment**

Antibiotic treatment limited our ability to recover the four main pathogenic bacteria cultured: *S. aureus*, *S.*

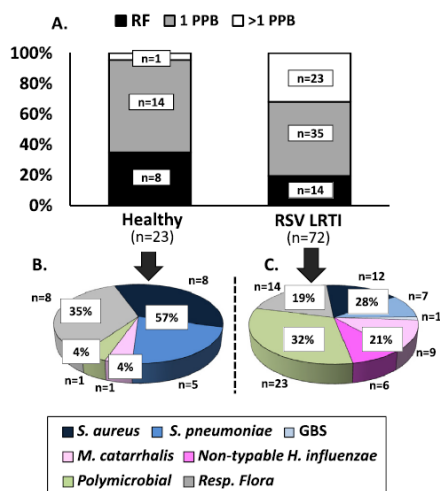
**Table 2** Demographic, laboratory, radiographic, and disease severity characteristics of infants hospitalized with RSV bronchiolitis based on antibiotic treatment.

	Treated with antibiotics (n = 64)	Not treated with antibiotics (n = 72)	P value
<b>Demographic characteristics</b>			
Age (months)	2.6 [1.5–5.1]	2.4 [1.5–4]	0.628
Gender [n (%)]			0.852
Male	39 (61)	45 (62.5)	
Female	25 (39)	27 (37.5)	
Race/Ethnicity [n (%)]			0.156
White	52 (81)	46 (64)	
Black	7 (11)	14 (19)	
Hispanic	2 (3)	4 (5.5)	
Other	3 (4)	8 (11)	
<b>Laboratory parameters</b>			
WBC performed [n (%)]	54 (84.3)	43 (59.7)	0.002
WBC/mm <sup>3</sup>	11.2 [9.1–14.57]	11.3 [7.9–12.8]	0.452
Neutrophils (%)	28.5 [16.0–39.0]	24.0 [17.0–31.0]	0.195
Lymphocytes (%)	47.8 $\pm$ 16.3	58.1 $\pm$ 12.9	0.001
Monocytes (%)	12.0 $\pm$ 5.6	10.9 $\pm$ 4.8	0.287
<b>Disease severity</b>			
Fever			0.094
Presence [n (%)]	49 (76)	45 (62)	0.288
Duration (days)	2 [1–4]	2 [1–3.5]	
O <sub>2</sub> requirements [n (%)]	48 (75)	56 (78)	0.703
Duration of O <sub>2</sub> (days)	2.2 [1–4]	1.5 [0.7–2.5]	0.016
CDSS [n]	5 [3–12]	5 [3–7]	0.340
LOS (days)	3 [2–5]	2 [2–3]	0.272
<b>Radiographic characteristics</b>			
Chest Rx [n (%)]	55 (86)	58 (80.5)	0.403
Chest Rx [n (%)]			0.013
Normal	4 (7)	3 (5)	
Bronch. wt/hyperinfl.	17 (31)	32 (55)	
Atelectasis	18 (33)	18 (31)	
Lobar Cons.	16 (29)	5 (9)	

WBC: white blood cell counts; LOS: length of hospital stay; O<sub>2</sub>: oxygen CDSS: clinical disease severity score; Rx: X-rays; bronch wt: bronchial wall thickening; hyperinfl: hyperinflation; Lobar cons: lobar consolidation. Data expressed as median values [interquartile ranges 25%–75%]. Numbers in parenthesis represent the percentage of subjects in each group. Mann–Whitney U test was used for analyses of continuous variables and Fisher's exact or Chi-square test for analyses of categorical data.

Bold highlights significant P values.

Please cite this article in press as: Suárez-Arrabal MC, et al., Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis, J Infect (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>



**Figure 2** Percentage and type of potentially pathogenic bacteria colonizing the nasopharynx in healthy controls and infants hospitalized with RSV LRTI. (A). The horizontal (X) axis represents the healthy controls and the group of infants with RSV LRTI who did not receive antibiotics. The vertical (Y) axis displays the percentage of NP pathogens identified: respiratory flora (black), one potential pathogenic bacteria (PPB, grey) and >1 PPB (white). Respiratory flora included the normal bacterial flora colonizing the upper respiratory tract. (B–C) Pie charts represent the percentage of respiratory flora, gram positive, gram-negative bacteria and >1 PPB present in NP samples from healthy infants (B) and infants with RSV LRTI not treated with antibiotics (C).

*pneumoniae*, non-typable *H. influenzae* or *M. catarrhalis*. Thus, to determine whether the frequency and type of NP bacterial colonization differed between RSV patients and controls and/or within RSV patients we included in subsequent analyses infants not treated with antibiotics. NP bacterial colonization with any of those four bacteria was documented in 65% (15/23) of healthy controls vs. 81% (58/72) of RSV + infants. In addition growth of >1 potentially pathogenic bacteria was significantly more common during RSV infection than in healthy controls (32% vs. 4%;  $p = 0.02$ ; Fig. 2A).

In RSV patients *S. aureus*, followed by *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* and non-typable *H. influenzae* were the single most common pathogens cultured while *S. aureus* and *S. pneumoniae* were the predominant pathogens found in healthy infants (Fig. 2 B–C). *Group-B streptococcus* was isolated twice: once as a single potential pathogen and once in combination with *S. aureus* and *S. pneumoniae*, and *S. pyogenes* once in combination with *S. aureus* and *M. catarrhalis*. Because of their young age, 43% of infants at enrollment had not received any doses of the standard vaccines. We did not find significant differences in the likelihood of recovering *S. pneumoniae* according to the rates of standard vaccination [ $\# S. pneumoniae/\#$  vaccine group]:

no vaccine (4/31; 13%) vs. 1 dose (9/25; 36%) vs. at least 2 doses (6/16; 38%);  $p = 0.06$ ).

Proportionally RSV infants were more frequently colonized with non-typable *H. influenzae* or *M. catarrhalis*, referred in the manuscript as gram-negative bacteria (GNB), while healthy controls were mostly colonized with *S. aureus* and *S. pneumoniae*, which we will refer as gram-positive bacteria (GPB,  $p < 0.01$ ). Bacterial growth was identified as moderate/many in the majority of RSV patients colonized with GNB (73%) as well as GPB (75%).

On the other hand only 7 out of 14 infants with non-RSV bronchiolitis (Fig. 1) did not receive antibiotics. Of those respiratory flora was cultured in one, non-typable *H. influenzae* in 3, *M. catarrhalis* in 2 patients, and *M. catarrhalis* + *S. aureus* in the third one.

### Clinical course and outcomes of RSV infants colonized with potentially pathogenic bacteria

Next we assessed whether the type of NP PPB colonization in RSV infected infants influenced disease severity after antibiotic adjustment. Except for attendance to day care or contact with school-age siblings the demographic characteristics among the 72 RSV + infants according to the presence and type of bacterial colonization (GNB, GPB) were comparable including days of symptoms at presentation (Table 3). Presence of fever was not different in patients colonized with pathogenic bacteria versus those with respiratory flora, although there was a trend towards higher  $T_{max}$  (38.3 °C [37.8–38.9] versus 37.8 °C [37.7–38.3];  $p = 0.065$ ) in infants colonized with pathogenic bacteria. There were no significant differences in oxygen requirement, length of hospitalization and the disease severity score between groups. However, duration of oxygen was longer in infants colonized with GNB vs GPB (2 vs 0.8 days respectively;  $p = 0.049$ ). In addition, percentage of blood neutrophils was significantly higher in children colonized with pathogenic bacteria versus respiratory flora; especially in those colonized with GNB. Blood cultures were performed in 33% and urine cultures in 17% of RSV infants and were all negative.

Chest-X rays were more commonly performed in patients colonized with pathogenic bacteria (88% versus 50% in respiratory flora;  $p = 0.003$ ), and lobar consolidation was present in 5/51 (10%) infants in the pathogenic bacteria group versus none in infants colonized with respiratory flora. In the pathogenic bacteria group, atelectasis or lobar consolidation was associated with higher clinical disease severity scores [CDSS, (7 [6–8.5] versus 4 [2–5] respectively;  $p = <0.001$ ) and a trend towards more frequent need for O<sub>2</sub> compared with infants with bronchial wall thickening or normal chest-X ray findings (95% vs 74% respectively;  $p = 0.07$ ). NP colonization with PPB was also associated with significantly higher white blood cell numbers in nasal wash (NW) samples, with no differences among bacterial types. Likewise, the percentage of neutrophils, the predominant immune cell type present in NW samples was not affected by the presence and type of pathogenic bacteria. In terms of the virus, RSV A was the predominant type across study groups, and RSV loads were not significantly different between groups.

Please cite this article in press as: Suárez-Arrabal MC, et al., Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis, J Infect (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>



## ARTICLE IN PRESS

RSV Bronchiolitis and NP bacterial colonization

7

Table 3 Demographic, Clinical and Disease Severity Characteristics of Infants with RSV LRTI colonized with NP potentially pathogenic bacteria (PPB) not treated with antibiotics.

	Resp. Flora <sup>1,2</sup> (n = 14)	Any PPB <sup>1</sup> (n = 58)	GNB <sup>2</sup> (n = 15)	GPB <sup>2</sup> (n = 20)	>1 PPB <sup>2</sup> (n = 23)	P value <sup>1</sup>	P value <sup>2</sup>
<b>Demographic characteristics</b>							
Age (months)	1.8 [1.2–2.8]	2.8 [1.5–4.0]	3.3 [1.8–6.3]	2.2 [1.3–3.7]	2.9 [1.3–4.0]	0.137	0.179
Gestational age (weeks)	39 [37–40]	40 [38–40]	40 [38–40]	40 [38–40]	39 [37–40]	0.624	0.584
Gender [n (%)]						1.000	0.980
Male	9 (64)	36 (62)	9 (60)	12 (60)	15 (65)		
Female	5 (36)	22 (38)	6 (40)	8 (40)	8 (35)		
Race/Ethnicity [n (%)]						0.474	0.967
White	9 (64)	37 (64)	9 (60)	14 (70)	14 (61)		
Black	2 (14)	12 (21)	4 (27)	3 (15)	5 (22)		
Other	3 (22)	9 (15)	2 (13)	3 (15)	4 (17)		
Breast feeding*	3/14 (21)	18/56 (32)	3/11 (27)	7/17 (41)	6/17 (35)		
Vaccination [n (%)]						0.529	0.666
Up to date	11 (79)	53 (91)	14 (93)	18 (90)	21 (91)	0.118	0.515
Incomplete	3 (21)	3 (5)	1 (7)	1 (5)	1 (4.5)		
Unknown	–	2 (4)	–	1 (5)	1 (4.5)		
Smoke exposure	7/10 (70)	21/44 (47)	7/13 (54)	6/14 (43)	8/17 (47)	0.297	0.582
Day care attendance or school age siblings	7/12 (58)	46/54 (85)	11/15 (73)	17/19 (90)	18/20 (90)	0.049	0.097
Clinical characteristics							
Days of symptoms*	3.5 [2–5]	4 [3–5]	5 [3–7]	5 [3–5]	4 [3–4]	0.234	0.088
Fever							
Presence [n(%)]	6 (43)	39 (67)	11 (73)	12 (60)	16 (70)	0.125	0.308
Duration (days)	1 [1–3]	2 [1–4]	2 [1–4]	1.5 [1–4]	2.5 [1.5–3]	0.239	0.502
Admission unit						0.648	0.885
ID ward	12 (86)	52 (90)	14 (93)	17 (85)	21 (91)		
PICU	2 (14)	6 (10)	1 (7)	3 (15)	2 (9)		
CDSS [n]	5 [2–6]	5 [3–7]	6 [4–7]	4 [3–7]	5 [2–8]	0.375	0.529
LOS (days)	2 [1.7–3.5]	2 [2–3]	3 [2–6]	2 [2–3]	2 [2–3]	0.445	0.329
Oxygen							
Basal O <sub>2</sub> sats (%)	89 [86–92]	87 [86–90]	87 [83–89]	87 [86–90]	88 [86–92]	0.303	0.228
Need for [n (%)]	9 (64)	47 (81)	14 (93)	17 (85)	16 (70)	0.279	0.158
Duration (days)	1.5 [1.1–2.8]	1.5 [0.5–2.5]	2 [1–3.7]	0.8 [0.2–1.9]	1.5 [0.6–2]	0.347	0.154
<b>Laboratory and imaging studies</b>							
WBC/mm <sup>3</sup>							
Performed	9 (64)	34 (59)	7 (47)	15 (75)	12 (52)	0.769	0.299
Value	10.7 [7.3–15.6]	11.3 [8.7–12.6]	9.1 [7.7–12.0]	10.4 [8.9–12.5]	12.1 [9.0–14.2]	0.743	0.671
Neutrophils (%)	17.1 ± 8.05	26.1 ± 10.63	32.57 ± 9.32	23.1 ± 9.11	26.2 ± 12.15	0.022	0.026
Lymphocytes (%)	65.2 ± 12.9	56.2 ± 12.3	50.2 ± 12.2	59.8 ± 12.1	55.2 ± 12.2	0.061	0.095
Monocytes (%)	10.2 ± 4.05	11.1 ± 5.0	12.7 ± 5.25	10.9 ± 6.10	10.3 ± 3.22	0.318	0.731
Chest Rx [n (%)]							
Obtained	7 (50)	51 (88)	13 (87)	19 (95)	19 (83)	0.003	0.015

(continued on next page)

Please cite this article in press as: Suárez-Arrabal MC, et al., Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis, J Infect (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>

Table 3 (continued)

	Resp. Flora <sup>1,2</sup> (n = 14)	Any PPB <sup>1</sup> (n = 58)	GNB <sup>2</sup> (n = 15)	GPB <sup>2</sup> (n = 20)	>1 PPB <sup>2</sup> (n = 23)	P value <sup>1</sup>	P value <sup>2</sup>
<b>Findings</b>							
Bwt/Hyperinfl.	4 (57)	31 (61)	8 (62)	12 (63)	11 (58)	0.835	0.946
Atelectasis	3 (43)	15 (29)	3 (23)	6 (32)	6 (32)		
Lobar Cons.	0 (0)	5 (10)	2 (15)	1 (5)	2 (10)		
<b>Respiratory samples studies</b>							
NW WBC/mm <sup>3</sup> (log <sub>10</sub> )	5.37 [5.0–5.9]	6.04 [5.5–6.5]	6.13 [5.7–6.5]	6.07 [5.0–6.4]	5.89 [5.7–6.5]	0.026	0.094
Neutrophils (%)	95 (90–99)	97 (94–98)	97 (93–97)	96 (93–98)	98 (94–98)	0.617	0.591
RSV RT-PCR							
Viral type							
RSV A	9 (64)	40 (73)	7 (50)	14 (70)	19 (90)		
RSV B	4 (29)	11 (20)	6 (43)	3 (15)	2 (10)	0.782	0.117
RSV A&B	1 (7)	4 (7)	1 (7)	3 (15)	—		
RSV loads (log <sub>10</sub> )	5.4 ± (0.7)	5.5 ± (1.0)	5.0 ± (1.1)	5.6 ± (1.1)	5.7 ± (0.8)	0.370	0.228

Data expressed in median values with 25–75 interquartile ranges. Numbers in parenthesis represent the percentage of subjects in each group. <sup>(1)</sup> comparisons between respiratory flora and any NP PPB by Mann–Whitney U test; <sup>(2)</sup> comparisons between respiratory flora, GNB, GPB and >1 PPB using Kruskal–Wallis analysis of variance (ANOVA), with Dunn's multiple comparisons post-test among groups. ID: Infectious Diseases; PICU: Pediatric Intensive Care Unit; CDSS: clinical disease severity score; LOS: length of hospitalization; WBC: white blood cell counts; Rx: X-ray; bwt: bronchial wall thickening, hyperinflation; hyperinfl: hyperinflation; lobar cons: lobar consolidation. NW: nasal wash. \*Breastfeeding and days of symptoms at enrollment. For the demographic variables breastfeeding, smoke exposure and day care attendance or exposure to school-age siblings the number of patients in whom that parameter was documented is included in the denominator. Gram-positive bacteria (GPB) refer to *S. pneumoniae*, *Group B streptococcus* and *S. aureus* and Gram-negative bacteria (GNB) to *M. catarrhalis* and non-typable *H. influenzae*.

Bold highlights significant P values.

### Plasma cytokine concentrations are increased in RSV infants colonized by Gram-negative bacteria

To determine whether innate immune responses were affected by the presence, density and type of NP bacterial colonization, we measured plasma concentrations of the inflammatory cytokines IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in a nested cohort of 44 infants: 34 with RSV LRTI (respiratory flora n = 7, GPB n = 19, GNB n = 8) and 10 healthy controls. This cohort was selected upon availability of plasma samples for analyses. As in the main patient cohort, duration of illness at admission, which could potentially have influenced the kinetics of serum pro-inflammatory cytokines, was comparable between groups (Table S2). Two patients colonized with GPB and 4 colonized with GNB received antibiotics at admission, thus analyses were performed also after adjusting for antibiotic treatment.

Plasma IL-6 and IL-8 concentrations were significantly higher only in RSV infants colonized with GNB compared with controls. Furthermore the increased concentrations of IL-6 or IL-8 were consistently observed independent of antibiotic use. On the other hand, there were no differences in plasma TNF-alpha concentrations among the study groups (Fig. 3A–F). In addition the density of bacterial growth in the NP was associated with increased production of IL-6 and IL-8 only in RSV + infants colonized with Gram-positive or Gram-negative bacteria but not in healthy controls (Fig. 4). While we found no associations between cytokine concentrations and disease severity in the overall RSV cohort, IL-6 concentrations correlated with the duration of O<sub>2</sub> (r = 0.68, p = 0.04) only in RSV patients colonized with Gram-negative bacteria.

### Discussion

In this study we sought to define the frequency and type of nasopharyngeal bacterial colonization in infants hospitalized with severe RSV LRTI and its potential impact on the mucosal and systemic inflammatory response and clinical disease severity. We also evaluated the impact of antibiotic therapy on both NP bacterial colonization and clinical outcomes. We found that: 1) RSV-infected infants were colonized with pathogenic bacteria more frequently and with a higher proportion of Gram-negative bacteria colonization than healthy age-matched controls; 2) colonization with pathogenic bacteria was associated with higher blood neutrophil percentages and greater number of nasal wash WBC, especially in those colonized with Gram-negative bacteria; 3) RSV-infected infants colonized with Gram-negative bacteria had increased concentrations of plasma IL-8 and IL-6, which correlated with longer need for oxygen; 4) lastly we found that antibiotic use was common and associated with a decreased likelihood of recovering NP bacteria by culture, but also that patients treated with antibiotics showed enhanced disease severity as defined by clinical parameters and radiologic findings.

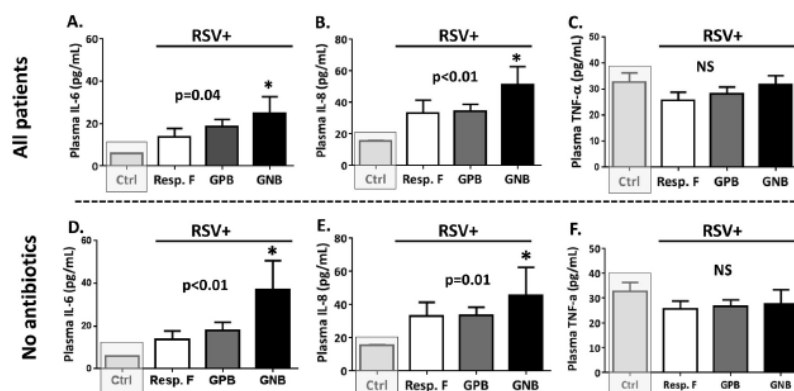
There is ample evidence derived from *in vitro* and animal studies suggesting that a preceding viral infection enhances the adhesion and recovery of pathogenic bacteria to the upper respiratory tract mucosa.<sup>13,14,34</sup> In rodents a previous RSV infection resulted in up to 100-fold greater

Please cite this article in press as: Suárez-Arrabal MC, et al., Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis, J Infect (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>

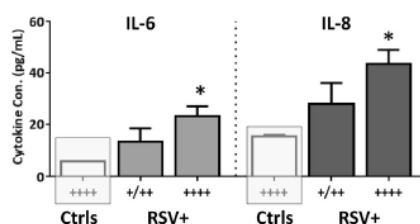
## ARTICLE IN PRESS

RSV Bronchiolitis and NP bacterial colonization

9



**Figure 3** Plasma cytokine concentrations according to the type of nasopharyngeal bacterial colonization. Plasma IL-6 (A & D), IL-8 (B & E) and TNF- $\alpha$  (C & F) concentrations were measured in a subset of healthy controls (Ctrl,  $n = 10$ , light grey), and infants with RSV LRTI colonized with respiratory flora (RF;  $n = 7$ , white), gram-positive bacteria (GPB;  $n = 19$ , charcoal) and gram-negative bacteria (GNB,  $n = 8$ , black). Gram-positive bacteria (GPB) refer to *S. pneumoniae*, Group B *Streptococcus* and *S. aureus* and Gram-negative bacteria (GNB) to *M. catarrhalis* and non-typable *H. influenzae*. The upper panel (A–C) represents cytokine concentrations in all infants independent of the antibiotic use, and the lower panel (D–F) the subset of children who did not receive antibiotics. Bar charts represent mean  $\pm$  SD. Comparisons made by one-way analyses of variance (ANOVA) and Dunnett's multiple comparisons test. Asterisks indicate the group (GNB) that is significantly different in relation to controls ( $P < 0.05$ ). No significant differences were found between children colonized with RF or GPB and controls.



**Figure 4** IL-6 and IL-8 concentrations according to the density of nasopharyngeal PPB. Twenty-seven patients with RSV LRTI in whom plasma cytokines were measured had either GPB ( $n = 19$ ) or GNB ( $n = 8$ ) identified. Bacterial growth was documented as rare/few in 26% (7/27) of patients while moderate to many in 74% (20/27). On the other hand 5 of the 10 healthy controls in which cytokines were measured had PPB identified and in all 5 bacterial growth was documented as moderate to many. White bars represent cytokine concentrations for healthy controls, which were below the limit of detection in all patients and for both cytokines, IL-6 and IL-8. Light grey bars represent IL-6 and charcoal bars IL-8 concentrations for rare/few (represented as +/+) and moderate/abundant bacterial growth (represented as ++++). Bar charts represent mean  $\pm$  SD. Comparisons made by ANOVA for IL-6 and IL-8 separately. Asterisks indicate significant differences between moderate/abundant growth in RSV patients and healthy controls (IL-6;  $p = 0.01$  and IL-8,  $p = 0.003$ ).

recovery of non-typable *H. influenzae* in the upper respiratory tract, and decreased clearance of *S. pneumoniae* in the lungs which was associated with enhanced lung pathology, weight loss and mortality.<sup>13,14,35,36</sup> The mechanisms responsible for enhanced bacterial adhesion, replication and lung pathology are unclear. It has been suggested that viral glycoproteins expressed on infected cells, such as the G glycoprotein, may act as receptors, upregulate the expression of host cell receptors increasing bacterial recognition and adhesion, or even bind directly to bacterial proteins. In addition, studies have shown that a preceding RSV infection may downregulate innate immune responses, such as beta-defensins, favoring bacterial replication.<sup>14,37</sup>

Different studies have shown that after excluding urinary tract infections, the rates of serious bacterial infections in infants with RSV bronchiolitis are low and around 1%.<sup>7,38,39</sup> Conversely, development of acute otitis media during RSV bronchiolitis, or soon after, has been documented in up to 60% of infants, with *S. pneumoniae* and *H. influenzae* followed by *M. catarrhalis* and *S. aureus* being the most common bacteria recovered.<sup>40,41</sup> In addition, studies have shown that 25 to 45% of infants hospitalized with bronchiolitis will have chest-X rays compatible with atelectasis or consolidation, but bacterial pathogens are rarely isolated from sterile sites making the diagnosis of bacterial pneumonia challenging.<sup>7</sup> In the present study, we found that RSV infants colonized with pathogenic bacteria and radiographic evidence of atelectasis or consolidation had worse disease severity as defined by the clinical disease severity score, compared with infants with bronchial wall thickening or normal chest-X ray findings.

Please cite this article in press as: Suárez-Arrabal MC, et al., Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis, J Infect (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>



## ARTICLE IN PRESS

10

M.C. Suárez-Arrabal et al.

Recently the American Academy of Pediatrics (AAP) released a revised version of the clinical guidelines published in 2006 to aid in the management of infants and young children with bronchiolitis. These guidelines recommended that antimicrobial therapy should be used only in children with bronchiolitis and specific indications for the coexistence of a bacterial infection.<sup>24,42</sup> Despite these recommendations, studies have shown that antibiotics are commonly used for the management of young children with bronchiolitis with rates that range from 10% to 50% depending on the study population (emergency department vs. inpatients).<sup>42–45</sup> In our study conducted in patients hospitalized with severe RSV LRTI, antibiotics were administered to 47% of patients, and those patients had worse clinical and radiologic findings. Whether patients with RSV LRTI that receive antibiotics represent a different disease severity phenotype warrants further studies.

The data regarding the role of bacterial colonization in children with RSV is limited. Most studies have included children >2 years old, which do not accurately reflect the peak age and main target population for severe RSV bronchiolitis. Hishiki et al. found that bacterial detection in the sputum of children <5 years old hospitalized with RSV LRTI was ~44% and was inversely related to age.<sup>46</sup> The most common bacteria identified were *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis*. Unfortunately, assessment of disease severity was not performed. Another study of 106 children <5 years old with community-acquired pneumonia showed that children with influenza, RSV or rhinovirus infection had 15-fold higher NP *S. pneumoniae* loads by PCR than the group without viral infections.<sup>47</sup> Recently a study also conducted in children <5 years old with RSV-pneumonia showed that those with alveolar involvement had significantly higher nasopharyngeal *S. pneumoniae* loads, lower oxygen saturation and higher rates of hospitalization than those with pneumonia but without alveolar involvement.<sup>21</sup> Two additional studies suggested that NP bacterial colonization in children with wheezing was associated with increased disease severity.<sup>22,23</sup> In the first study, 60% of children hospitalized with a first episode of wheezing and colonized with potentially pathogenic bacteria had longer duration of hospitalization and greater likelihood of developing recurrent wheezing than children who were not colonized.<sup>23</sup> In the second study, NP colonization was found in 56% of children with bronchiolitis and in 82% of children with recurrent wheezing and was associated with longer hospitalizations and cyanosis only in the latter group.<sup>22</sup> In those non-controlled studies, NP bacterial colonization was studied in children up to 3 years of age with viral induced wheezing in relation to disease severity, but independent of the viral pathogen identified, which could have influenced the results, as RSV per se is an independent risk factor for increased severity in bronchiolitis.<sup>7,48,49</sup>

In the present study, to better define the impact of NP bacterial colonization in a more homogeneous population, we limited enrollment to infants with a first episode RSV bronchiolitis and compared them with healthy age-matched controls. We found that 65% of healthy controls were colonized with pathogenic bacteria, compared to 81% of RSV infected infants after controlling for antibiotic treatment. The most frequent bacteria cultured was *S. aureus*, followed by *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* and non-

typable *H. influenzae*, but only infants colonized with Gram-negative bacteria required oxygen for a significantly longer period and had increased plasma concentrations of inflammatory cytokines (IL-6 and IL-8). In addition cytokine concentrations were detected in a dose dependent manner in relation to the quantity of Gram-positive or Gram-negative bacteria growth only in RSV + infants. Together these results suggest that RSV infection may alter the host nasopharynx environment by facilitating Gram-negative bacteria colonization, which in turn modified the local and systemic inflammatory response and possibly enhanced disease severity.

Our study has limitations. A number of infants had received antibiotics at enrollment, which limited our ability to recover pathogenic bacteria and may have introduced potential for bias in the subset analyses. We were not able to determine if infants requiring PICU care had a different bacterial profile than those hospitalized in the inpatient ward or in patients with milder upper respiratory tract disease evaluated in the outpatient setting. Nevertheless, we were able to analyze a subset of infants not treated with antibiotics and found that NP colonization with potentially pathogenic bacteria was associated with increased number of inflammatory cells in the mucosal and systemic compartment, especially in those colonized with Gram-negative bacteria. RSV diagnosis was made in 96% of patients mostly by DFA or rapid antigen testing per standard of care, which limited our ability to identify potential viral co-infections. Although the role of viral co-infections on disease severity is still under debate they may have influenced the laboratory and clinical parameters. We could not establish a causal relationship between colonization with pathogenic bacteria and enhanced disease severity, or between the detection of bacteria in the upper and lower respiratory tract, since only six patients required intubation. Nevertheless, we found indirect evidence such as increased inflammatory markers and abnormal radiographic patterns suggesting that identification of these bacteria in the nasopharynx is more than a passive phenomenon.

In summary, and with limitations possibly related to sample size, this study represents a first step to help unravel the conundrum of RSV-bacterial interactions in one of the most relevant populations, infants with severe RSV LRTI. Further studies using more sensitive diagnostics tools, such as deep sequencing and/or PCR in combination with comprehensive host immune profiles are needed to better characterize the role of NP bacterial colonization in the clinical manifestations of the disease and to help clarify the need for targeted antimicrobial therapy in this setting.

## Disclosure

This work was supported in part by intramural grants to AM and OR and by the 2010 Ausonia & Arbora grant by the Asociación Española de Pediatría to MCSA.

This study was approved by the Institutional Review Board (IRB) at Nationwide Children's Hospital (IRB #10-00028), classified as a Level 1 risk clinical study – no greater than minimal risk (pursuant under 45 CFR 46.404; and 21 CFR 50.51). Informed consent procedures followed

Please cite this article in press as: Suárez-Arrabal MC, et al., Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis, J Infect (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>



## ARTICLE IN PRESS

RSV Bronchiolitis and NP bacterial colonization

11

in compliance with Nationwide Children's Research Responsible Conduct Guidelines.

### Conflict of interest

The authors do not declare any financial or commercial conflict of interest.

### Acknowledgments

We would like to thank the Clinical Research Department at Nationwide Children's Hospital, in particular Gail Arthur, RN and Michael Lawson RN for their efforts with patient enrollment, Cynthia Burch for her help with bacterial cultures, Sara Mertz, BS for performing RSV loads determination, Lisa Hanson, BS for her help with cytokine processing and specially our patients and their families for agreeing to participate in the study.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>.

### References

- Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980–1996. *JAMA* 1999;282:1440–6.
- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2010;375:1545–55.
- Groothuis JR, Hoopes JM, Jessie VG. Prevention of serious respiratory syncytial virus-related illness. I: disease pathogenesis and early attempts at prevention. *Adv Ther* 2011;28:91–109.
- Langley GF, Anderson LJ. Epidemiology and prevention of respiratory syncytial virus infections among infants and young children. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30:510–7.
- Kristensen K, Hjulter T, Ravn H, Simoes EA, Stensballe LG. Chronic diseases, chromosomal abnormalities, and congenital malformations as risk factors for respiratory syncytial virus hospitalization: a population-based cohort study. *Clin Infect Dis* 2012;54:810–7.
- Bloemers BL, van Furth AM, Weijerman ME, Gemke RJ, Broers CJ, van den Ende K, et al. Down syndrome: a novel risk factor for respiratory syncytial virus bronchiolitis—a prospective birth-cohort study. *Pediatrics* 2007;120:e1076–81.
- Garcia CG, Bhoré R, Soriano-Fallas A, Trost M, Chason R, Ramilo O, et al. Risk factors in children hospitalized with RSV bronchiolitis versus non-RSV bronchiolitis. *Pediatrics* 2010;126:e1453–60.
- Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 2009;360:588–98.
- Mella C, Suarez-Arrabal MC, Lopez S, Stephens J, Fernandez S, Hall MW, et al. Innate immune dysfunction is associated with enhanced disease severity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 2013;207:564–73.
- Pettigrew MM, Gent JF, Revai K, Patel JA, Chonmaitree T. Microbial interactions during upper respiratory tract infections. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1584–91.
- Murphy TF, Bakaletz LO, Smeesters PR. Microbial interactions in the respiratory tract. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:S121–6.
- Xu Q, Almudervar A, Casey JR, Pichichero ME. Nasopharyngeal bacterial interactions in children. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1738–45.
- Hament JM, Aerts PC, Fleer A, Van Dijk H, Harmsen T, Kimpen JL, et al. Enhanced adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Pediatr Res* 2004;55:972–8.
- McGillivray G, Mason KM, Jurcisek JA, Peeples ME, Bakaletz LO. Respiratory syncytial virus-induced dysregulation of expression of a mucosal beta-defensin augments colonization of the upper airway by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Cell Microbiol* 2009;11:1399–408.
- Ampofo K, Bender J, Sheng X, Korgenski K, Daly J, Pavia AT, et al. Seasonal invasive pneumococcal disease in children: role of preceding respiratory viral infection. *Pediatrics* 2008;122:229–37.
- Weinberger DM, Givon-Lavi N, Shemer-Avni Y, Bar-Ziv J, Alonso WJ, Greenberg D, et al. Influence of pneumococcal vaccines and syncytial virus on alveolar pneumonia, Israel. *Emerg Infect Dis* 2013;19:1084–91.
- Madhi SA, Klugman KP. A role for *Streptococcus pneumoniae* in virus-associated pneumonia. *Nat Med* 2004;10:811–3.
- Talbot TR, Poehling KA, Hartert TV, Arbogast PG, Halasa NB, Edwards KK, et al. Seasonality of invasive pneumococcal disease: temporal relation to documented influenza and respiratory syncytial viral circulation. *Am J Med* 2005;118:285–91.
- Techasaensiri B, Techasaensiri C, Mejias A, McCracken Jr GH, Ramilo O. Viral coinfections in children with invasive pneumococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:519–23.
- Weinberger DM, Klugman KP, Steiner CA, Simonsen L, Viboud C. Association between respiratory syncytial virus activity and pneumococcal disease in infants: a time series analysis of US hospitalization data. *PLoS Med* 2015;12:e1001776.
- Espósito S, Zampiero A, Terranova L, Ierardi V, Ascolese B, Daleno C, et al. Pneumococcal bacterial load colonization as a marker of mixed infection in children with alveolar community-acquired pneumonia and respiratory syncytial virus or rhinovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32:1199–204.
- Yu D, Wei L, Zhengxiu L, Jian L, Lijia W, Wei L, et al. Impact of bacterial colonization on the severity, and accompanying airway inflammation, of virus-induced wheezing in children. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1399–404.
- Jartti T, Kuneinen S, Lehtinen P, Pettola V, Vuorinen T, Leinonen M, et al. Nasopharyngeal bacterial colonization during the first wheezing episode is associated with longer duration of hospitalization and higher risk of relapse in young children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30:233–41.
- Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, Alverson BK, Baley JE, Gadomski AM, et al. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. *Pediatrics* 2014;134:e1474–502.
- Gualdi L, Mertz S, Gomez AM, Ramilo O, Wittke A, Mejias A. Lack of effect of bovine lactoferrin in respiratory syncytial virus replication and clinical disease severity in the mouse model. *Antiviral Res* 2013;99:188–95.
- Garcia C, Soriano-Fallas A, Lozano J, Leos N, Gomez AM, Ramilo O, et al. Decreased innate immune cytokine responses correlate with disease severity in children with respiratory syncytial virus and human rhinovirus bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:86–9.
- Mejias A, Dimo B, Suarez NM, Garcia C, Suarez-Arrabal MC, Jartti T, et al. Whole blood gene expression profiles to assess

Please cite this article in press as: Suárez-Arrabal MC, et al., Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis, *J Infect* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>

## ARTICLE IN PRESS

12

M.C. Suárez-Arrabal et al.

- pathogenesis and disease severity in infants with respiratory syncytial virus infection. *PLoS Med* 2013;10:e1001549.
28. Sheeran P, Jafri H, Carubelli C, Saavedra J, Johnson C, Krisher K, et al. Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:115–22.
  29. Gill MA, Palucka AK, Barton T, Ghaffar F, Jafri H, Banchereau J, et al. Mobilization of plasmacytoid and myeloid dendritic cells to mucosal sites in children with respiratory syncytial virus and other viral respiratory infections. *J Infect Dis* 2005;191:1105–15.
  30. Malley R, DeVincenzo J, Ramilo O, Dennehy PH, Meissner HC, Gruber WC, et al. Reduction of respiratory syncytial virus (RSV) in tracheal aspirates in intubated infants by use of humanized monoclonal antibody to RSV F protein. *J Infect Dis* 1998;178:1555–61.
  31. Gill MA, Long K, Kwon T, Muniz L, Mejias A, Connolly J, et al. Differential recruitment of dendritic cells and monocytes to respiratory mucosal sites in children with influenza virus or respiratory syncytial virus infection. *J Infect Dis* 2008;198:1667–76.
  32. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Bailey WR. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. 12th ed. St. Louis, MO: Elsevier Mosby; 2007.
  33. Hall MW, Gavriliu MA, Knatz NL, Duncan MD, Fernandez SA, Wewers MD. Monocyte mRNA phenotype and adverse outcomes from pediatric multiple organ dysfunction syndrome. *Pediatr Res* 2007;62:597–603.
  34. Avadhanula V, Wang Y, Portner A, Adderson E. Nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* bind respiratory syncytial virus glycoprotein. *J Med Microbiol* 2007;56:1133–7.
  35. Stark JM, Stark MA, Colasurdo GN, LeVine AM. Decreased bacterial clearance from the lungs of mice following primary respiratory syncytial virus infection. *J Med Virol* 2006;78:829–38.
  36. Jordan-Villegas A, Chang M, Khoar S, Gomez AM, McCracken GH, Mejias A, et al. Respiratory syncytial virus (RSV) infection predisposes mice to severe pneumococcal disease and bacteremia. Infectious Diseases Society of America 48th Annual Meeting; 2010.
  37. Smith CM, Sandrini S, Datta S, Freestone P, Shafeeq S, Radhakrishnan P, et al. Respiratory syncytial virus increases the virulence of *Streptococcus pneumoniae* by binding to penicillin binding protein 1a. A new paradigm in respiratory infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:196–207.
  38. Purcell K, Fergie J. Concurrent serious bacterial infections in 912 infants and children hospitalized for treatment of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:267–9.
  39. Levine DA, Platt SL, Dayan PS, Macias CG, Zorc JJ, Krief W, et al. Risk of serious bacterial infection in young febrile infants with respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics* 2004;113:1728–34.
  40. Andrade MA, Hoberman A, Glustein J, Paradise JL, Wald ER. Acute otitis media in children with bronchiolitis. *Pediatrics* 1998;101:617–9.
  41. Goma MA, Galal O, Mahmoud MS. Risk of acute otitis media in relation to acute bronchiolitis in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012;76:49–51.
  42. Florin TA, Byczkowski T, Ruddy RM, Zorc JJ, Test M, Shah SS. Variation in the management of infants hospitalized for bronchiolitis persists after the 2006 American Academy of Pediatrics bronchiolitis guidelines. *J Pediatr* 2014;165:786–792 e1.
  43. Johnson LW, Robles J, Hudgins A, Osburn S, Martin D, Thompson A. Management of bronchiolitis in the emergency department: impact of evidence-based guidelines? *Pediatrics* 2013;131(Suppl. 1):S103–9.
  44. Akenroye AT, Baskin MN, Samnaliev M, Stack AM. Impact of a bronchiolitis guideline on ED resource use and cost: a segmented time-series analysis. *Pediatrics* 2014;133:e227–34.
  45. Parikh K, Hall M, Teach SJ. Bronchiolitis management before and after the AAP guidelines. *Pediatrics* 2014;133:e1–7.
  46. Hishiki H, Ishiwada N, Fukasawa C, Abe K, Hoshino T, Aizawa J, et al. Incidence of bacterial coinfection with respiratory syncytial virus bronchopulmonary infection in pediatric inpatients. *J Infect Chemother* 2011;17:87–90.
  47. Vu HT, Yoshida LM, Suzuki M, Nguyen HA, Nguyen CD, Nguyen AT, et al. Association between nasopharyngeal load of *Streptococcus pneumoniae*, viral coinfection, and radiologically confirmed pneumonia in Vietnamese children. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30:11–8.
  48. DeVincenzo JP, El Saleeby CM, Bush AJ. Respiratory syncytial virus load predicts disease severity in previously healthy infants. *J Infect Dis* 2005;191:1861–8.
  49. Bamberger E, Srugo I, Abu Raya B, Segal E, Chaim B, Kassir I, et al. What is the clinical relevance of respiratory syncytial virus bronchiolitis?: findings from a multi-center, prospective study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis: Official Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2012;31:3323–30.

Please cite this article in press as: Suárez-Arrabal MC, et al., Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis, *J Infect* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.010>

## **CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFÍA**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

### 10.1. BIBLIOGRAFÍA

1. Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. American journal of hygiene. 1957;66(3):281-90.
2. Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. Paediatric respiratory reviews. 2004;5 Suppl A:S119-26.
3. Groothuis JR, Hoopes JM, Jessie VG. Prevention of serious respiratory syncytial virus-related illness. I: Disease pathogenesis and early attempts at prevention. Advances in therapy. 2011;28(2):91-109.
4. Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. Virus research. 2011;162(1-2):80-99.
5. Openshaw PJ, Tregoning JS. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. Clinical microbiology reviews. 2005;18(3):541-55.
6. Sorce LR. Respiratory syncytial virus: from primary care to critical care. Journal of pediatric health care : official publication of National Association of Pediatric Nurse Associates & Practitioners. 2009;23(2):101-8.
7. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. Jama. 1999;282(15):1440-6.
8. Garcia CG, Bhore R, Soriano-Fallas A, Trost M, Chason R, Ramilo O, et al. Risk factors in children hospitalized with RSV bronchiolitis versus non-RSV bronchiolitis. Pediatrics. 2010;126(6):e1453-60.
9. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. The New England journal of medicine. 2009;360(6):588-98.
10. Fjaerli HO, Farstad T, Bratlid D. Hospitalisations for respiratory syncytial virus bronchiolitis in Akershus, Norway, 1993-2000: a population-based retrospective study. BMC pediatrics. 2004;4(1):25.

11. Cappelletty D. Microbiology of bacterial respiratory infections. *The Pediatric infectious disease journal*. 1998;17(8 Suppl):S55-61.
12. Pettigrew MM, Gent JF, Revai K, Patel JA, Chonmaitree T. Microbial interactions during upper respiratory tract infections. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(10):1584-91.
13. van den Bergh MR, Biesbroek G, Rossen JW, de Steenhuijsen Piters WA, Bosch AA, van Gils EJ, et al. Associations between pathogens in the upper respiratory tract of young children: interplay between viruses and bacteria. *PloS one*. 2012;7(10):e47711.
14. Murphy TF, Faden H, Bakaletz LO, Kyd JM, Forsgren A, Campos J, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* as a pathogen in children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2009;28(1):43-8.
15. Revai K, Mamidi D, Chonmaitree T. Association of nasopharyngeal bacterial colonization during upper respiratory tract infection and the development of acute otitis media. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46(4):e34-7.
16. Anh DD, Huong Ple T, Watanabe K, Nguyet NT, Anh NT, Thi NT, et al. Increased rates of intense nasopharyngeal bacterial colonization of Vietnamese children with radiological pneumonia. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2007;213(2):167-72.
17. Tenenbaum T, Franz A, Neuhausen N, Willems R, Brade J, Schweitzer-Krantz S, et al. Clinical characteristics of children with lower respiratory tract infections are dependent on the carriage of specific pathogens in the nasopharynx. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2012;31(11):3173-82.
18. Jartti T, Kuneinen S, Lehtinen P, Peltola V, Vuorinen T, Leinonen M, et al. Nasopharyngeal bacterial colonization during the first wheezing episode is associated with longer duration of hospitalization and higher risk of relapse in young children. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2011;30(2):233-41.

19. Yu D, Wei L, Zhengxiu L, Jian L, Lijia W, Wei L, et al. Impact of bacterial colonization on the severity, and accompanying airway inflammation, of virus-induced wheezing in children. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010;16(9):1399-404.
20. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, Bonnelykke K, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *The New England journal of medicine*. 2007;357(15):1487-95.
21. Yamamoto T, Shimojo N, Igoshi Y, Ozawa N, Yamaide F, Nakano T, et al. Association between bacterial colonization of the nasopharynx in 1-month-old infants and the development of wheeze during the first year of life. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013;68 SUPPL. 98(54-)
22. Hyde ER, Petrosino JF, Piedra PA, Camargo CA, Jr., Espinola JA, Mansbach JM. Nasopharyngeal Proteobacteria are associated with viral etiology and acute wheezing in children with severe bronchiolitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(4):1220-2.
23. Teo SM, Mok D, Pham K, Kusel M, Serralha M, Troy N, et al. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell host & microbe*. 2015;17(5):704-15.
24. Gevers D, Knight R, Petrosino JF, Huang K, McGuire AL, Birren BW, et al. The Human Microbiome Project: a community resource for the healthy human microbiome. *PLoS biology*. 2012;10(8):e1001377.
25. Human Microbiome Project C. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14.
26. Ursell LK, Clemente JC, Rideout JR, Gevers D, Caporaso JG, Knight R. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(5):1204-8.
27. Eberl G. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. *Mucosal immunology*. 2010;3(5):450-60.



28. Lu X, Kurago Z, Brogden KA. Effects of polymicrobial communities on host immunity and response. *FEMS microbiology letters*. 2006;265(2):141-50.
29. Viswanathan M, King VJ, Bordley C, Honeycutt AA, Wittenborn J, Jackman AM, et al. Management of bronchiolitis in infants and children. Evidence report/technology assessment. 2003(69):1-5.
30. McConnochie KM. Bronchiolitis. What's in the name? *American journal of diseases of children*. 1983;137(1):11-3.
31. Grupo de Trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre Bronquiolitis Aguda. Fundació Sant Joan de Déu, coordinador. Guía de Práctica Clínica sobre Bronquiolitis Aguda. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social. Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques; 2010. Guías de Práctica Clínica en el SNS: AATRM. Nº 2007/05
32. Bloomfield P, Dalton D, Karleka A, Kesson A, Duncan G, Isaacs D. Bacteraemia and antibiotic use in respiratory syncytial virus infections. *Archives of disease in childhood*. 2004;89(4):363-7.
33. Mejias A, Ramilo O. Defining the burden of respiratory syncytial virus infection. *Jornal de pediatria*. 2013;89(6):517-9.
34. Hasegawa K, Tsugawa Y, Brown DF, Mansbach JM, Camargo CA, Jr. Trends in bronchiolitis hospitalizations in the United States, 2000-2009. *Pediatrics*. 2013;132(1):28-36.
35. Lucion MF, Juarez Mdel V, Viegas M, Castellano V, Romanin VS, Grobaporto M, et al. Respiratory syncytial virus: clinical and epidemiological pattern in pediatric patients admitted to a children's hospital between 2000 and 2013. *Archivos argentinos de pediatria*. 2014;112(5):397-404.
36. Speranza AM, Clary AL, Pereira T, Sapoznicoff L, Schenone N. Estudio multicentrico de infecciones respiratorias bajas em ninos hospitalizados menores de dos años. *Archivos argentinos de pediatria*. 2003;101(6):365-73.
37. Hall CB, Simoes EA, Anderson LJ. Clinical and epidemiologic features of respiratory syncytial virus. *Current topics in microbiology and immunology*. 2013;372:39-57.



38. Hasegawa K, Tsugawa Y, Brown DF, Mansbach JM, Camargo CA, Jr. Temporal trends in emergency department visits for bronchiolitis in the United States, 2006 to 2010. *The Pediatric infectious disease journal*. 2014;33(1):11-8.
39. Mansbach JM, Piedra PA, Teach SJ, Sullivan AF, Forgey T, Clark S, et al. Prospective multicenter study of viral etiology and hospital length of stay in children with severe bronchiolitis. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 2012;166(8):700-6.
40. Hasegawa K, Jartti T, Mansbach JM, Laham FR, Jewell AM, Espinola JA, et al. Respiratory syncytial virus genomic load and disease severity among children hospitalized with bronchiolitis: multicenter cohort studies in the United States and Finland. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(10):1550-9.
41. Estripeaut D, Torres JP, Somers CS, Tagliabue C, Khokhar S, Bhoj VG, et al. Respiratory syncytial virus persistence in the lungs correlates with airway hyperreactivity in the mouse model. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(10):1435-43.
42. Piedra PA, Stark AR. Bronchiolitis in infants and children: Clinical features and diagnosis. 10 junio 2015. [citado 15 junio 2015] En: UpToDate, Post TW (Ed) [Internet]. Waltham, MA.
43. Miller EK, Gebretsadik T, Carroll KN, Dupont WD, Mohamed YA, Morin LL, et al. Viral etiologies of infant bronchiolitis, croup and upper respiratory illness during 4 consecutive years. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(9):950-5.
44. Stockman LJ, Curns AT, Anderson LJ, Fischer-Langley G. Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among infants and young children in the United States, 1997-2006. *The Pediatric infectious disease journal*. 2012;31(1):5-9.
45. Chavez-Bueno S, Mejias A, Gomez AM, Olsen KD, Rios AM, Fonseca-Aten M, et al. Respiratory syncytial virus-induced acute and chronic airway disease is independent of genetic background: an experimental murine model. *Virology journal*. 2005;2:46.
46. Viegas M. Epidemiología molecular del virus sincicial respiratorio en pacientes pediátricos en un período de seis años. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 2011;45:3-45.

47. Roberts SR, Compans RW, Wertz GW. Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells. *Journal of virology*. 1995;69(4):2667-73.
48. Lambert L, Sagfors AM, Openshaw PJ, Culley FJ. Immunity to RSV in Early-Life. *Frontiers in immunology*. 2014;5:466.
49. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *Jama*. 2003;289(2):179-86.
50. Esposito S, Piralla A, Zampiero A, Bianchini S, Di Pietro G, Scala A, et al. Characteristics and Their Clinical Relevance of Respiratory Syncytial Virus Types and Genotypes Circulating in Northern Italy in Five Consecutive Winter Seasons. *PloS one*. 2015;10(6):e0129369.
51. Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *The Journal of general virology*. 1985;66 ( Pt 10):2111-24.
52. Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *The Journal of general virology*. 1998;79 ( Pt 9):2221-9.
53. Zlateva KT, Vijgen L, Dekeersmaecker N, Naranjo C, Van Ranst M. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(9):3022-30.
54. Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 9):2117-24.
55. Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, et al. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *The Journal of infectious diseases*. 1990;162(6):1283-90.

56. Tran DN, Pham TM, Ha MT, Tran TT, Dang TK, Yoshida LM, et al. Molecular epidemiology and disease severity of human respiratory syncytial virus in Vietnam. *PloS one*. 2013;8(1):e45436.
57. Agrawal AS, Sarkar M, Ghosh S, Chawla-Sarkar M, Chakraborty N, Basak M, et al. Prevalence of respiratory syncytial virus group B genotype BA-IV strains among children with acute respiratory tract infection in Kolkata, Eastern India. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;45(4):358-61.
58. Moreno-Perez D, Calvo C, Five Study G. Epidemiological and clinical data of hospitalizations associated with respiratory syncytial virus infection in children under 5 years of age in Spain: FIVE multicenter study. *Influenza and other respiratory viruses*. 2014;8(2):209-16.
59. Bardach A, Rey-Ares L, Cafferata ML, Cormick G, Romano M, Ruvinsky S, et al. Systematic review and meta-analysis of respiratory syncytial virus infection epidemiology in Latin America. *Reviews in medical virology*. 2014;24(2):76-89.
60. Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, Alverson BK, Baley JE, Gadomski AM, et al. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. *Pediatrics*. 2014;134(5):e1474-502.
61. Hall CB, Weinberg GA, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Schultz AF, et al. Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among children less than 24 months of age. *Pediatrics*. 2013;132(2):e341-8.
62. Leader S, Kohlhase K. Respiratory syncytial virus-coded pediatric hospitalizations, 1997 to 1999. *The Pediatric infectious disease journal*. 2002;21(7):629-32.
63. Murray J, Bottle A, Sharland M, Modi N, Aylin P, Majeed A, et al. Risk factors for hospital admission with RSV bronchiolitis in England: a population-based birth cohort study. *PloS one*. 2014;9(2):e89186.
64. Sommer C, Resch B, Simoes EA. Risk factors for severe respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *The open microbiology journal*. 2011;5:144-54.

65. Alvarez AE, Marson FA, Bertuzzo CS, Arns CW, Ribeiro JD. Epidemiological and genetic characteristics associated with the severity of acute viral bronchiolitis by respiratory syncytial virus. *Jornal de pediatria*. 2013;89(6):531-43.
66. Barr FE, Graham BS. Respiratory syncytial virus infection: Clinical features and diagnosis. 29 septiembre 2014. [citado 15 junio 2015] En: UpToDate, Post TW (Ed) [Internet]. Waltham, MA.
67. Díez Domingo J, Ridao Lopez M, Ubeda Sansano I, Ballester Sanz A. [Incidence and cost of hospitalizations for bronchiolitis and respiratory syncytial virus infections in the autonomous community of Valencia in Spain (2001 and 2002)]. *Anales de pediatria*. 2006;65(4):325-30.
68. Bonillo Perales A, DíezDelgado Rubio J, Ortega Montes A, Infante Marquez P, Jimenez Liria M, Batlles Garrido J, et al. [Perinatal history and hospitalization for bronchiolitis. A comparison with the impact-RSV Study Group]. *Anales espanoles de pediatria*. 2000;53(6):527-32.
69. Vicente D, Montes M, Cilla G, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Hospitalization for respiratory syncytial virus in the paediatric population in Spain. *Epidemiology and infection*. 2003;131(2):867-72.
70. Gil-Prieto R, Gonzalez-Escalada A, Marin-Garcia P, Gallardo-Pino C, Gil-de-Miguel A. Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in Children up to 5 Years of Age in Spain: Epidemiology and Comorbidities: An Observational Study. *Medicine*. 2015;94(21):e831.
71. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010;375(9725):1545-55.
72. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095-128.
73. Pineros JG, Baquero H, Bastidas J, Garcia J, Ovalle O, Patino CM, et al. Respiratory syncytial virus infection as a cause of hospitalization in population under 1 year in Colombia. *Jornal de pediatria*. 2013;89(6):544-8.

74. Brand HK, de Groot R, Galama JM, Brouwer ML, Teuwen K, Hermans PW, et al. Infection with multiple viruses is not associated with increased disease severity in children with bronchiolitis. *Pediatric pulmonology*. 2012;47(4):393-400.
75. Mullins JA, Lamonte AC, Bresee JS, Anderson LJ. Substantial variability in community respiratory syncytial virus season timing. *The Pediatric infectious disease journal*. 2003;22(10):857-62.
76. Pitzer VE, Viboud C, Alonso WJ, Wilcox T, Metcalf CJ, Steiner CA, et al. Environmental drivers of the spatiotemporal dynamics of respiratory syncytial virus in the United States. *PLoS pathogens*. 2015;11(1):e1004591.
77. Yusuf S, Piedimonte G, Auais A, Demmler G, Krishnan S, Van Caeselele P, et al. The relationship of meteorological conditions to the epidemic activity of respiratory syncytial virus. *Epidemiology and infection*. 2007;135(7):1077-90.
78. Stensballe LG, Devasundaram JK, Simoes EA. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. *The Pediatric infectious disease journal*. 2003;22(2 Suppl):S21-32.
79. McGuinness CB, Boron ML, Saunders B, Edelman L, Kumar VR, Rabon-Stith KM. Respiratory syncytial virus surveillance in the United States, 2007-2012: results from a national surveillance system. *The Pediatric infectious disease journal*. 2014;33(6):589-94.
80. Terletskaia-Ladwig E, Enders G, Schalasta G, Enders M. Defining the timing of respiratory syncytial virus (RSV) outbreaks: an epidemiological study. *BMC infectious diseases*. 2005;5:20.
81. Centers for Disease C, Prevention. Respiratory syncytial virus--United States, July 2007-June 2011. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2011;60(35):1203-6.
82. Eisenhut M. Extrapulmonary manifestations of severe RSV bronchiolitis. *Lancet*. 2006;368(9540):988.
83. Jafri HS, Chavez-Bueno S, Mejias A, Gomez AM, Rios AM, Nassi SS, et al. Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway

hyperresponsiveness in mice. *The Journal of infectious diseases*. 2004;189(10):1856-65.

84. Welliver RC, Sr. The immune response to respiratory syncytial virus infection: friend or foe? *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2008;34(2):163-73.

85. Hall CB, Douglas RG, Jr., Geiman JM. Quantitative shedding patterns of respiratory syncytial virus in infants. *The Journal of infectious diseases*. 1975;132(2):151-6.

86. Hall CB, Douglas RG, Jr., Geiman JM. Respiratory syncytial virus infections in infants: quantitation and duration of shedding. *The Journal of pediatrics*. 1976;89(1):11-5.

87. American Academy of Pediatrics. Respiratory syncytial virus. In: Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS, editors. *Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases*. 28th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2009. p. 560-9.

88. Zhou L, Xiao Q, Zhao Y, Huang A, Ren L, Liu E. The impact of viral dynamics on the clinical severity of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Journal of medical virology*. 2015;87(8):1276-84.

89. El Saleeby CM, Bush AJ, Harrison LM, Aitken JA, Devincenzo JP. Respiratory syncytial virus load, viral dynamics, and disease severity in previously healthy naturally infected children. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204(7):996-1002.

90. Houben ML, Coenjaerts FE, Rossen JW, Belderbos ME, Hofland RW, Kimpen JL, et al. Disease severity and viral load are correlated in infants with primary respiratory syncytial virus infection in the community. *Journal of medical virology*. 2010;82(7):1266-71.

91. Fodha I, Vabret A, Ghedira L, Seboui H, Chouchane S, Dewar J, et al. Respiratory syncytial virus infections in hospitalized infants: association between viral load, virus subgroup, and disease severity. *Journal of medical virology*. 2007;79(12):1951-8.

92. Bagga B, Woods CW, Veldman TH, Gilbert A, Mann A, Balaratnam G, et al. Comparing influenza and RSV viral and disease dynamics in experimentally infected

adults predicts clinical effectiveness of RSV antivirals. *Antiviral therapy*. 2013;18(6):785-91.

93. Buckingham SC, Bush AJ, Devincenzo JP. Nasal quantity of respiratory syncytial virus correlates with disease severity in hospitalized infants. *The Pediatric infectious disease journal*. 2000;19(2):113-7.

94. DeVincenzo JP, Wilkinson T, Vaishnav A, Cehelsky J, Meyers R, Nochur S, et al. Viral load drives disease in humans experimentally infected with respiratory syncytial virus. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;182(10):1305-14.

95. Scagnolari C, Midulla F, Selvaggi C, Monteleone K, Bonci E, Papoff P, et al. Evaluation of viral load in infants hospitalized with bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *Medical microbiology and immunology*. 2012;201(3):311-7.

96. Wright PF, Gruber WC, Peters M, Reed G, Zhu Y, Robinson F, et al. Illness severity, viral shedding, and antibody responses in infants hospitalized with bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *The Journal of infectious diseases*. 2002;185(8):1011-8.

97. Bosis S, Esposito S, Niesters HG, Zuccotti GV, Marseglia G, Lanari M, et al. Role of respiratory pathogens in infants hospitalized for a first episode of wheezing and their impact on recurrences. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14(7):677-84.

98. Franz A, Adams O, Willems R, Bonzel L, Neuhausen N, Schweizer-Krantz S, et al. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2010;48(4):239-45.

99. Adams O, Weis J, Jasinska K, Vogel M, Tenenbaum T. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and Rhinovirus respiratory tract infections in young children admitted to hospital. *Journal of medical virology*. 2015;87(2):275-80.

100. Mella C, Suarez-Arrabal MC, Lopez S, Stephens J, Fernandez S, Hall MW, et al. Innate immune dysfunction is associated with enhanced disease severity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Journal of infectious diseases*. 2013;207(4):564-73.
101. Bennett BL, Garofalo RP, Cron SG, Hosakote YM, Atmar RL, Macias CG, et al. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(10):1532-40.
102. Mejias A, Hall MW, Ramilo O. Immune monitoring of children with respiratory syncytial virus infection. *Expert review of clinical immunology*. 2013;9(5):393-5.
103. Papadopoulos NG, Gourgiotis D, Javadyan A, Bossios A, Kallergi K, Psarras S, et al. Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? *Respiratory medicine*. 2004;98(9):879-82.
104. Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. *Journal of clinical microbiology*. 1994;32(1):1-4.
105. McConnochie KM, Hall CB, Walsh EE, Roghmann KJ. Variation in severity of respiratory syncytial virus infections with subtype. *The Journal of pediatrics*. 1990;117(1 Pt 1):52-62.
106. Walsh EE, McConnochie KM, Long CE, Hall CB. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *The Journal of infectious diseases*. 1997;175(4):814-20.
107. Neves Barreira J, Fonseca C, Cardoso M, Azevedo A, Bonito Vitor A. [Relationship between respiratory syncytial virus subtype and clinical severity in bronchiolitis]. *Anales espanoles de pediatria*. 2001;54(6):559-66.
108. Brouard J, Freymuth F, Constantini S, Petitjean J, de Schrevel G, Duhamel JF. [Prevalence and clinical aspects of A and B subgroups of respiratory syncytial virus infection. Observation of 8 consecutive epidemics between 1982 and 1990]. *Archives francaises de pediatrie*. 1993;50(8):639-43.



109. Wang EE, Law BJ, Stephens D. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) prospective study of risk factors and outcomes in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. *The Journal of pediatrics*. 1995;126(2):212-9.
110. Panayiotou C, Richter J, Koliou M, Kalogirou N, Georgiou E, Christodoulou C. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children in Cyprus during three consecutive winter seasons (2010-2013): age distribution, seasonality and association between prevalent genotypes and disease severity. *Epidemiology and infection*. 2014;142(11):2406-11.
111. Jafri HS, Wu X, Makari D, Henrickson KJ. Distribution of respiratory syncytial virus subtypes A and B among infants presenting to the emergency department with lower respiratory tract infection or apnea. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(4):335-40.
112. Mejias A, Yang CH, García CG, Khokhar S, Chávez-Bueno S, Somers C, et al. Respiratory Syncytial Virus (RSV) Genetic Variability and Viral Loads Do Not Correlate with Disease Severity in Children Hospitalized with Bronchiolitis. *Infectious Diseases Society of America 48th Annual Meeting 2010; Friday, October 22, 2010; Vancouver*.
113. Devincenzo JP. Natural infection of infants with respiratory syncytial virus subgroups A and B: a study of frequency, disease severity, and viral load. *Pediatric research*. 2004;56(6):914-7.
114. Martinello RA, Chen MD, Weibel C, Kahn JS. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(6):839-42.
115. Fletcher JN, Smyth RL, Thomas HM, Ashby D, Hart CA. Respiratory syncytial virus genotypes and disease severity among children in hospital. *Archives of disease in childhood*. 1997;77(6):508-11.
116. Luchsinger V, Ampuero S, Palomino MA, Chnaiderman J, Levican J, Gaggero A, et al. Comparison of virological profiles of respiratory syncytial virus and rhinovirus in acute lower tract respiratory infections in very young Chilean infants, according to

their clinical outcome. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2014;61(1):138-44.

117. Tabatabai J, Prifert C, Pfeil J, Grulich-Henn J, Schnitzler P. Novel respiratory syncytial virus (RSV) genotype ON1 predominates in Germany during winter season 2012-13. *PloS one*. 2014;9(10):e109191.

118. Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PloS one*. 2012;7(3):e32807.

119. Yasui K, Baba A, Iwasaki Y, Kubo T, Aoyama K, Mori T, et al. Neutrophil-mediated inflammation in respiratory syncytial viral bronchiolitis. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society*. 2005;47(2):190-5.

120. Bueno SM, Gonzalez PA, Riedel CA, Carreno LJ, Vasquez AE, Kalergis AM. Local cytokine response upon respiratory syncytial virus infection. *Immunology letters*. 2011;136(2):122-9.

121. Lukacs NW, Smit JJ, Schaller MA, Lindell DM. Regulation of immunity to respiratory syncytial virus by dendritic cells, toll-like receptors, and notch. *Viral immunology*. 2008;21(2):115-22.

122. Bueno SM, Gonzalez PA, Pacheco R, Leiva ED, Cautivo KM, Tobar HE, et al. Host immunity during RSV pathogenesis. *International immunopharmacology*. 2008;8(10):1320-9.

123. Senft AP, Taylor RH, Lei W, Campbell SA, Tipper JL, Martinez MJ, et al. Respiratory syncytial virus impairs macrophage IFN-alpha/beta- and IFN-gamma-stimulated transcription by distinct mechanisms. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;42(4):404-14.

124. Faden H, Hong JJ, Ogra PL. Interaction of polymorphonuclear leukocytes and viruses in humans: adherence of polymorphonuclear leukocytes to respiratory syncytial virus-infected cells. *Journal of virology*. 1984;52(1):16-23.

125. Moore ML, Stokes KL, Hartert TV. The impact of viral genotype on pathogenesis and disease severity: respiratory syncytial virus and human rhinoviruses. *Current opinion in immunology*. 2013;25(6):761-8.
126. Stokes KL, Currier MG, Sakamoto K, Lee S, Collins PL, Plemper RK, et al. The respiratory syncytial virus fusion protein and neutrophils mediate the airway mucin response to pathogenic respiratory syncytial virus infection. *Journal of virology*. 2013;87(18):10070-82.
127. Mejias A, Dimo B, Suarez NM, Garcia C, Suarez-Arrabal MC, Jartti T, et al. Whole blood gene expression profiles to assess pathogenesis and disease severity in infants with respiratory syncytial virus infection. *PLoS medicine*. 2013;10(11):e1001549.
128. Gill MA, Palucka AK, Barton T, Ghaffar F, Jafri H, Banchereau J, et al. Mobilization of plasmacytoid and myeloid dendritic cells to mucosal sites in children with respiratory syncytial virus and other viral respiratory infections. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(7):1105-15.
129. Wang H, Peters N, Schwarze J. Plasmacytoid dendritic cells limit viral replication, pulmonary inflammation, and airway hyperresponsiveness in respiratory syncytial virus infection. *Journal of immunology*. 2006;177(9):6263-70.
130. Smit JJ, Rudd BD, Lukacs NW. Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(5):1153-9.
131. Chen ZM, Mao JH, Du LZ, Tang YM. Association of cytokine responses with disease severity in infants with respiratory syncytial virus infection. *Acta paediatrica*. 2002;91(9):914-22.
132. Brand HK, Ferwerda G, Preijers F, de Groot R, Neeleman C, Staal FJ, et al. CD4+ T-cell counts and interleukin-8 and CCL-5 plasma concentrations discriminate disease severity in children with RSV infection. *Pediatric research*. 2013;73(2):187-93.
133. Sheeran P, Jafri H, Carubelli C, Saavedra J, Johnson C, Krisner K, et al. Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *The Pediatric infectious disease journal*. 1999;18(2):115-22.

134. Moreno-Solis G, Torres-Borrego J, de la Torre-Aguilar MJ, Fernandez-Gutierrez F, Llorente-Cantarero FJ, Perez-Navero JL. Analysis of the local and systemic inflammatory response in hospitalized infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Allergologia et immunopathologia*. 2015;43(3):264-71.
135. McNamara PS, Flanagan BF, Selby AM, Hart CA, Smyth RL. Pro- and anti-inflammatory responses in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The European respiratory journal*. 2004;23(1):106-12.
136. Diaz PV, Gaggero AA, Pinto RA, Mamani R, Uasapud PA, Bono MR. [Levels of inflammatory cytokines and plasma cortisol in respiratory syncytial virus bronchiolitis]. *Revista medica de Chile*. 2013;141(5):574-81.
137. Arruvito L, Raiden S, Geffner J. Host response to respiratory syncytial virus infection. *Current opinion in infectious diseases*. 2015;28(3):259-66.
138. Serrano Hernandez A. [Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis]. *Reumatologia clinica*. 2009;5 Suppl 1:1-5.
139. Christiaansen AF, Knudson CJ, Weiss KA, Varga SM. The CD4 T cell response to respiratory syncytial virus infection. *Immunologic research*. 2014;59(1-3):109-17.
140. Lee DC, Harker JA, Tregoning JS, Atabani SF, Johansson C, Schwarze J, et al. CD25+ natural regulatory T cells are critical in limiting innate and adaptive immunity and resolving disease following respiratory syncytial virus infection. *Journal of virology*. 2010;84(17):8790-8.
141. Huang H, Saravia J, You D, Shaw AJ, Cormier SA. Impaired gamma delta T cell-derived IL-17A and inflammasome activation during early respiratory syncytial virus infection in infants. *Immunology and cell biology*. 2015;93(2):126-35.
142. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004;21(4):467-76.
143. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;168(6):633-9.

144. Kristjansson S, Bjarnarson SP, Wennergren G, Palsdottir AH, Arnadottir T, Haraldsson A, et al. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses during the first 3 months of life promote a local TH2-like response. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;116(4):805-11.
145. Caballero MT, Serra ME, Acosta PL, Marzec J, Gibbons L, Salim M, et al. TLR4 genotype and environmental LPS mediate RSV bronchiolitis through Th2 polarization. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(2):571-82.
146. Flores P, Guimaraes J, Videira Amaral JM. Th1 and th2 cytokine expression in nasopharyngeal secretions during acute bronchiolitis in children younger than two years old. *Allergologia et immunopathologia*. 2011;39(1):3-9.
147. Becker Y. Respiratory syncytial virus (RSV) evades the human adaptive immune system by skewing the Th1/Th2 cytokine balance toward increased levels of Th2 cytokines and IgE, markers of allergy--a review. *Virus genes*. 2006;33(2):235-52.
148. Garcia C, Soriano-Fallas A, Lozano J, Leos N, Gomez AM, Ramilo O, et al. Decreased innate immune cytokine responses correlate with disease severity in children with respiratory syncytial virus and human rhinovirus bronchiolitis. *The Pediatric infectious disease journal*. 2012;31(1):86-9.
149. Larranaga CL, Ampuero SL, Luchsinger VF, Carrion FA, Aguilar NV, Morales PR, et al. Impaired immune response in severe human lower tract respiratory infection by respiratory syncytial virus. *The Pediatric infectious disease journal*. 2009;28(10):867-73.
150. Welliver TP, Garofalo RP, Hosakote Y, Hintz KH, Avendano L, Sanchez K, et al. Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(8):1126-36.
151. Rossey I, Sedeyn K, De Baets S, Schepens B, Saelens X. CD8+ T cell immunity against human respiratory syncytial virus. *Vaccine*. 2014;32(46):6130-7.
152. Duttweiler L, Nadal D, Frey B. Pulmonary and systemic bacterial co-infections in severe RSV bronchiolitis. *Archives of disease in childhood*. 2004;89(12):1155-7.

153. Lopez Guinea A, Casado Flores J, Martin Sobrino MA, Espinola Docio B, de la Calle Cabrera T, Serrano A, et al. [Severe bronchiolitis. Epidemiology and clinical course of 284 patients]. *Anales de pediatria*. 2007;67(2):116-22.
154. Brooks AM, McBride JT, McConnochie KM, Aviram M, Long C, Hall CB. Predicting deterioration in previously healthy infants hospitalized with respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics*. 1999;104(3 Pt 1):463-7.
155. Svensson C, Berg K, Sigurs N, Trollfors B. Incidence, risk factors and hospital burden in children under five years of age hospitalised with respiratory syncytial virus infections. *Acta paediatrica*. 2015.
156. Boyce TG, Mellen BG, Mitchel EF, Jr., Wright PF, Griffin MR. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid. *The Journal of pediatrics*. 2000;137(6):865-70.
157. Purcell K, Fergie J. Driscoll Children's Hospital respiratory syncytial virus database: risk factors, treatment and hospital course in 3308 infants and young children, 1991 to 2002. *The Pediatric infectious disease journal*. 2004;23(5):418-23.
158. Miyairi I, DeVincenzo JP. Human genetic factors and respiratory syncytial virus disease severity. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(4):686-703.
159. Zhang M, Lu Y, Zhang X, Lu A, Wang L, Chen C. Interleukin-4 polymorphism is associated with severity of respiratory syncytial virus infection. *Journal of paediatrics and child health*. 2015.
160. Puthothu B, Bierbaum S, Kopp MV, Forster J, Heinze J, Weckmann M, et al. Association of TNF-alpha with severe respiratory syncytial virus infection and bronchial asthma. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2009;20(2):157-63.
161. Tal G, Mandelberg A, Dalal I, Cesar K, Somekh E, Tal A, et al. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *The Journal of infectious diseases*. 2004;189(11):2057-63.
162. Puthothu B, Forster J, Heinzmann A, Krueger M. TLR-4 and CD14 polymorphisms in respiratory syncytial virus associated disease. *Disease markers*. 2006;22(5-6):303-8.

163. Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(3):371-84.
164. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *The New England journal of medicine*. 2005;352(17):1749-59.
165. Branche AR, Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in older adults: an under-recognized problem. *Drugs & aging*. 2015;32(4):261-9.
166. Kneyber MC, Brandenburg AH, de Groot R, Joosten KF, Rothbarth PH, Ott A, et al. Risk factors for respiratory syncytial virus associated apnoea. *European journal of pediatrics*. 1998;157(4):331-5.
167. Committee on Infectious Diseases From the American Academy of Pediatrics: Policy statements--Modified recommendations for use of palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics*. 2009;124(6):1694-701.
168. Groothuis JR, Gutierrez KM, Lauer BA. Respiratory syncytial virus infection in children with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*. 1988;82(2):199-203.
169. MacDonald NE, Hall CB, Suffin SC, Alexson C, Harris PJ, Manning JA. Respiratory syncytial viral infection in infants with congenital heart disease. *The New England journal of medicine*. 1982;307(7):397-400.
170. Navas L, Wang E, de Carvalho V, Robinson J. Improved outcome of respiratory syncytial virus infection in a high-risk hospitalized population of Canadian children. *Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada. The Journal of pediatrics*. 1992;121(3):348-54.
171. Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *The Journal of pediatrics*. 2003;143(5 Suppl):S112-7.
172. Thorburn K. Pre-existing disease is associated with a significantly higher risk of death in severe respiratory syncytial virus infection. *Archives of disease in childhood*. 2009;94(2):99-103.

173. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious D, American Academy of Pediatrics Bronchiolitis Guidelines C. Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics*. 2014;134(2):415-20.
174. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious D, American Academy of Pediatrics Bronchiolitis Guidelines C. Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics*. 2014;134(2):e620-38.
175. Gonzalez de Dios J, Ochoa Sangrador C, Grupo de revision y panel de expertos de la Conferencia de Consenso del Proyecto aBREVIADo. [Consensus conference on acute bronchiolitis (I): methodology and recommendations]. *Anales de pediatria*. 2010;72(3):221 e1- e33.
176. Lee YI, Peng CC, Chiu NC, Huang DT, Huang FY, Chi H. Risk factors associated with death in patients with severe respiratory syncytial virus infection. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2014.
177. Ison MG. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses in the setting of bone marrow transplantation. *Current opinion in oncology*. 2009;21(2):171-6.
178. Shah JN, Chemaly RF. Management of RSV infections in adult recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(10):2755-63.
179. Waghmare A, Campbell AP, Xie H, Seo S, Kuypers J, Leisenring W, et al. Respiratory syncytial virus lower respiratory disease in hematopoietic cell transplant recipients: viral RNA detection in blood, antiviral treatment, and clinical outcomes. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;57(12):1731-41.
180. McCurdy LH, Milstone A, Dummer S. Clinical features and outcomes of paramyxoviral infection in lung transplant recipients treated with ribavirin. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2003;22(7):745-53.
181. Pelaez A, Lyon GM, Force SD, Ramirez AM, Neujahr DC, Foster M, et al. Efficacy of oral ribavirin in lung transplant patients with respiratory syncytial virus lower



respiratory tract infection. The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation. 2009;28(1):67-71.

182. Neemann K, Freifeld A. Respiratory Syncytial Virus in Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Solid-Organ Transplantation. Current infectious disease reports. 2015;17(7):490.

183. Danziger-Isakov LA, Arslan D, Sweet S, Benden C, Goldfarb S, Wong J. RSV prevention and treatment in pediatric lung transplant patients: a survey of current practices among the International Pediatric Lung Transplant Collaborative. Pediatric transplantation. 2012;16(6):638-44.

184. Hasegawa K, Pate BM, Mansbach JM, Macias CG, Fisher ES, Piedra PA, et al. Risk factors for requiring intensive care among children admitted to ward with bronchiolitis. Academic pediatrics. 2015;15(1):77-81.

185. Gijtenbeek RG, Kerstjens JM, Reijneveld SA, Duiverman EJ, Bos AF, Vrijlandt EJ. RSV infection among children born moderately preterm in a community-based cohort. European journal of pediatrics. 2015;174(4):435-42.

186. Simoes EA. Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. The Journal of pediatrics. 2003;143(5 Suppl):S118-26.

187. Wu A, Budge PJ, Williams J, Griffin MR, Edwards KM, Johnson M, et al. Incidence and Risk Factors for Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus Infections among Children in the Remote Highlands of Peru. PloS one. 2015;10(6):e0130233.

188. Weber MW, Milligan P, Hilton S, Lahai G, Whittle H, Mulholland EK, et al. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection leading to hospital admission in children in the Western Region of The Gambia. International journal of epidemiology. 1999;28(1):157-62.

189. Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H, Schildgen O, Schweitzer-Krantz S, Adams O. Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. The Pediatric infectious disease journal. 2008;27(7):589-94.

190. Harada Y, Kinoshita F, Yoshida LM, Minh le N, Suzuki M, Morimoto K, et al. Does respiratory virus coinfection increase the clinical severity of acute respiratory infection among children infected with respiratory syncytial virus? *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(5):441-5.
191. Marcone DN, Ellis A, Videla C, Ekstrom J, Ricarte C, Carballal G, et al. Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized and outpatient children in Buenos Aires, Argentina. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(3):e105-10.
192. Sly PD, Jones CM. Viral co-detection in infants hospitalized with respiratory disease: is it important to detect? *Jornal de pediatria*. 2011;87(4):277-80.
193. Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta paediatrica*. 2009;98(1):123-6.
194. Rodriguez R, Ramilo O. Respiratory syncytial virus: how, why and what to do. *The Journal of infection*. 2014;68 Suppl 1:S115-8.
195. Richard N, Komurian-Pradel F, Javouhey E, Perret M, Rajoharison A, Bagnaud A, et al. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *The Pediatric infectious disease journal*. 2008;27(3):213-7.
196. Cilla G, Onate E, Perez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. *Journal of medical virology*. 2008;80(10):1843-9.
197. Calvo C, Garcia-Garcia ML, Blanco C, Vazquez MC, Frias ME, Perez-Brena P, et al. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2008;42(3):268-72.
198. Brunstein JD, Cline CL, McKinney S, Thomas E. Evidence from multiplex molecular assays for complex multipathogen interactions in acute respiratory infections. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(1):97-102.
199. Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, Eun BW, Kim NH, Lee JA, et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children,

2000-2005. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006;43(5):585-92.

200. De Paulis M, Gilio AE, Ferraro AA, Ferronato AE, do Sacramento PR, Botosso VF, et al. Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. *Jornal de pediatria*. 2011;87(4):307-13.

201. Berger TM, Aebi C, Duppenhaler A, Stocker M, Swiss Pediatric Surveillance U. Prospective population-based study of RSV-related intermediate care and intensive care unit admissions in Switzerland over a 4-year period (2001-2005). *Infection*. 2009;37(2):109-16.

202. Dhakal R, Sujatha S, Parija SC, Bhat BV. Asymptomatic colonization of upper respiratory tract by potential bacterial pathogens. *Indian journal of pediatrics*. 2010;77(7):775-8.

203. Rotimi VO, Duerden BI. The development of the bacterial flora in normal neonates. *Journal of medical microbiology*. 1981;14(1):51-62.

204. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-10.

205. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutrition reviews*. 2012;70 Suppl 1:S38-44.

206. Garcia-Rodriguez JA, Fresnadillo Martinez MJ. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2002;50 Suppl S2:59-73.

207. Ghaffar F, Muniz LS, Katz K, Smith JL, Shouse T, Davis P, et al. Effects of large dosages of amoxicillin/clavulanate or azithromycin on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, nonpneumococcal alpha-hemolytic streptococci, and *Staphylococcus aureus* in children with acute otitis media. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002;34(10):1301-9.

208. Bosch AA, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EA, Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS pathogens*. 2013;9(1):e1003057.

209. Murphy TF, Bakaletz LO, Smeesters PR. Microbial interactions in the respiratory tract. *The Pediatric infectious disease journal*. 2009;28(10 Suppl):S121-6.
210. Tsai MH, Huang SH, Chen CL, Chiu CY, Hua MC, Liao SL, et al. Pathogenic Bacterial Nasopharyngeal Colonization and Its Impact on Respiratory Diseases in the First Year of Life: The PATCH Birth Cohort Study. *The Pediatric infectious disease journal*. 2015;34(6):652-8.
211. Pugin J, Auckenthaler R, Lew DP, Suter PM. Oropharyngeal decontamination decreases incidence of ventilator-associated pneumonia. A randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Jama*. 1991;265(20):2704-10.
212. Garrouste-Orgeas M, Chevret S, Arlet G, Marie O, Rouveau M, Popoff N, et al. Oropharyngeal or gastric colonization and nosocomial pneumonia in adult intensive care unit patients. A prospective study based on genomic DNA analysis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;156(5):1647-55.
213. Robinson J. Colonization and infection of the respiratory tract: What do we know? *Paediatrics & child health*. 2004;9(1):21-4.
214. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;184(8):957-63.
215. Wilson R, Dowling RB, Jackson AD. The biology of bacterial colonization and invasion of the respiratory mucosa. *The European respiratory journal*. 1996;9(7):1523-30.
216. Ries M, Kostic M, Zadavec D, Drvis P, Ajduk J, Trotic R. Nasopharyngeal bacterial flora in healthy preschool children during winter-spring months. *Collegium antropologicum*. 2013;37(2):415-22.
217. Shak JR, Vidal JE, Klugman KP. Influence of bacterial interactions on pneumococcal colonization of the nasopharynx. *Trends in microbiology*. 2013;21(3):129-35.
218. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children.

Tonawanda/Williamsville Pediatrics. The Journal of infectious diseases. 1997;175(6):1440-5.

219. Faden H, Harabuchi Y, Hong JJ. Epidemiology of *Moraxella catarrhalis* in children during the first 2 years of life: relationship to otitis media. The Journal of infectious diseases. 1994;169(6):1312-7.

220. De Lencastre H, Kristinsson KG, Brito-Avo A, Sanches IS, Sa-Leao R, Saldanha J, et al. Carriage of respiratory tract pathogens and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* colonization in healthy children attending day care centers in Lisbon, Portugal. Microbial drug resistance. 1999;5(1):19-29.

221. Leiberman A, Dagan R, Leibovitz E, Yagupsky P, Fliss DM. The bacteriology of the nasopharynx in childhood. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 1999;49 Suppl 1:S151-3.

222. Syrjanen RK, Kilpi TM, Kaijalainen TH, Herva EE, Takala AK. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Finnish children younger than 2 years old. The Journal of infectious diseases. 2001;184(4):451-9.

223. Principi N, Marchisio P, Schito GC, Mannelli S. Risk factors for carriage of respiratory pathogens in the nasopharynx of healthy children. Ascanius Project Collaborative Group. The Pediatric infectious disease journal. 1999;18(6):517-23.

224. Hament JM, Aerts PC, Fleer A, van Dijk H, Harmsen T, Kimpen JL, et al. Direct binding of respiratory syncytial virus to pneumococci: a phenomenon that enhances both pneumococcal adherence to human epithelial cells and pneumococcal invasiveness in a murine model. Pediatric research. 2005;58(6):1198-203.

225. Mallia P, Footitt J, Sotero R, Jepson A, Contoli M, Trujillo-Torralbo MB, et al. Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. American journal of respiratory and critical care medicine. 2012;186(11):1117-24.

226. Avadhanula V, Rodriguez CA, DeVincenzo JP, Wang Y, Webby RJ, Ulett GC, et al. Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. Journal of virology. 2006;80(4):1629-36.

227. Austrian R. Some aspects of the pneumococcal carrier state. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1986;18 Suppl A:35-45.
228. Niederman MS. The pathogenesis of airway colonization: lessons learned from the study of bacterial adherence. *The European respiratory journal*. 1994;7(10):1737-40.
229. Jiang Z, Nagata N, Molina E, Bakaletz LO, Hawkins H, Patel JA. Fimbria-mediated enhanced attachment of nontypeable *Haemophilus influenzae* to respiratory syncytial virus-infected respiratory epithelial cells. *Infection and immunity*. 1999;67(1):187-92.
230. Reddy MS, Bernstein JM, Murphy TF, Faden HS. Binding between outer membrane proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* and human nasopharyngeal mucin. *Infection and immunity*. 1996;64(4):1477-9.
231. St Geme JW, 3rd. The HMW1 adhesin of nontypeable *Haemophilus influenzae* recognizes sialylated glycoprotein receptors on cultured human epithelial cells. *Infection and immunity*. 1994;62(9):3881-9.
232. St Geme JW, 3rd. The pathogenesis of nontypable *Haemophilus influenzae* otitis media. *Vaccine*. 2000;19 Suppl 1:S41-50.
233. Aebi C, Lafontaine ER, Cope LD, Latimer JL, Lumbley SL, McCracken GH, Jr., et al. Phenotypic effect of isogenic *uspA1* and *uspA2* mutations on *Moraxella catarrhalis* 035E. *Infection and immunity*. 1998;66(7):3113-9.
234. McMichael JC, Fiske MJ, Fredenburg RA, Chakravarti DN, VanDerMeid KR, Barniak V, et al. Isolation and characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope. *Infection and immunity*. 1998;66(9):4374-81.
235. Friedel V, Chang A, Wills J, Vargas R, Xu Q, Pichichero ME. Impact of respiratory viral infections on alpha-hemolytic streptococci and otopathogens in the nasopharynx of young children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(1):27-31.
236. Smith H, Sweet C. Cooperation between Viral and Bacterial Pathogens in Causing Human Respiratory Disease. In: Brogden KA, Guthmiller JM, editors. *Polymicrobial Diseases*. Washington (DC): ASM Press; 2002. Chapter 11.

237. Deng JC. Viral-bacterial interactions-therapeutic implications. *Influenza and other respiratory viruses*. 2013;7 Suppl 3:24-35.
238. Wolter N, Tempia S, Cohen C, Madhi SA, Venter M, Moyes J, et al. High nasopharyngeal pneumococcal density, increased by viral coinfection, is associated with invasive pneumococcal pneumonia. *The Journal of infectious diseases*. 2014;210(10):1649-57.
239. Skevaki CL, Trochoutsou AI, Tsiata P, Logotheti I, Makrinioti CN, Lebessi E, et al. The role of viral infections in nasopharyngeal bacterial colonisation in children: A case-control study. *Clinical Microbiology and Infection* 2012;18. SUPPL. 3 (222).
240. Peltola VT, McCullers JA. Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. *The Pediatric infectious disease journal*. 2004;23(1 Suppl):S87-97.
241. McCullers JA. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(3):571-82.
242. McCullers JA, Rehg JE. Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(3):341-50.
243. LeVine AM, Koeningsknecht V, Stark JM. Decreased pulmonary clearance of *S. pneumoniae* following influenza A infection in mice. *Journal of virological methods*. 2001;94(1-2):173-86.
244. Giebink GS. Otitis media: the chinchilla model. *Microbial drug resistance*. 1999;5(1):57-72.
245. Madhi SA, Schoub B, Klugman KP. Interaction between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* in severe pneumonia. *Expert review of respiratory medicine*. 2008;2(5):663-72.
246. Hament JM, Aerts PC, Fleer A, Van Dijk H, Harmsen T, Kimpen JL, et al. Enhanced adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Pediatric research*. 2004;55(6):972-8.

247. McGillivray G, Mason KM, Jurcisek JA, Peeples ME, Bakaletz LO. Respiratory syncytial virus-induced dysregulation of expression of a mucosal beta-defensin augments colonization of the upper airway by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Cellular microbiology*. 2009;11(9):1399-408.
248. Elahmer OR, Raza MW, Ogilvie MM, Blackwell CC, Weir DM, Elton RA. The effect of respiratory virus infection on expression of cell surface antigens associated with binding of potentially pathogenic bacteria. *Advances in experimental medicine and biology*. 1996;408:169-77.
249. Kimaro Mlacha SZ, Peret TC, Kumar N, Romero-Steiner S, Dunning Hotopp JC, Ishmael N, et al. Transcriptional adaptation of pneumococci and human pharyngeal cells in the presence of a virus infection. *BMC genomics*. 2013;14:378.
250. Patel J, Faden H, Sharma S, Ogra PL. Effect of respiratory syncytial virus on adherence, colonization and immunity of non-typable *Haemophilus influenzae*: implications for otitis media. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 1992;23(1):15-23.
251. Raza MW, Ogilvie MM, Blackwell CC, Stewart J, Elton RA, Weir DM. Effect of respiratory syncytial virus infection on binding of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* type b to a human epithelial cell line (HEp-2). *Epidemiology and infection*. 1993;110(2):339-47.
252. Raza MW, El Ahmer OR, Ogilvie MM, Blackwell CC, Saadi AT, Elton RA, et al. Infection with respiratory syncytial virus enhances expression of native receptors for non-pilate *Neisseria meningitidis* on HEp-2 cells. *FEMS immunology and medical microbiology*. 1999;23(2):115-24.
253. Saadi AT, Blackwell CC, Raza MW, James VS, Stewart J, Elton RA, et al. Factors enhancing adherence of toxigenic *Staphylococcus aureus* to epithelial cells and their possible role in sudden infant death syndrome. *Epidemiology and infection*. 1993;110(3):507-17.
254. Saadi AT, Blackwell CC, Essery SD, Raza MW, el Ahmer OR, MacKenzie DA, et al. Developmental and environmental factors that enhance binding of *Bordetella pertussis*



to human epithelial cells in relation to sudden infant death syndrome (SIDS). *FEMS immunology and medical microbiology*. 1996;16(1):51-9.

255. Van Ewijk BE, Wolfs TF, Aerts PC, Van Kessel KP, Fler A, Kimpen JL, et al. RSV mediates *Pseudomonas aeruginosa* binding to cystic fibrosis and normal epithelial cells. *Pediatric research*. 2007;61(4):398-403.

256. de Vrankrijker AM, Wolfs TF, Ciofu O, Hoiby N, van der Ent CK, Poulsen SS, et al. Respiratory syncytial virus infection facilitates acute colonization of *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Journal of medical virology*. 2009;81(12):2096-103.

257. Avadhanula V, Wang Y, Portner A, Adderson E. Nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* bind respiratory syncytial virus glycoprotein. *Journal of medical microbiology*. 2007;56(Pt 9):1133-7.

258. Raza MW, Blackwell CC, Ogilvie MM, Saadi AT, Stewart J, Elton RA, et al. Evidence for the role of glycoprotein G of respiratory syncytial virus in binding of *Neisseria meningitidis* to HEp-2 cells. *FEMS immunology and medical microbiology*. 1994;10(1):25-30.

259. Smith CM, Sandrini S, Datta S, Freestone P, Shafeeq S, Radhakrishnan P, et al. Respiratory syncytial virus increases the virulence of *Streptococcus pneumoniae* by binding to penicillin binding protein 1a. A new paradigm in respiratory infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;190(2):196-207.

260. Stark JM, Stark MA, Colasurdo GN, LeVine AM. Decreased bacterial clearance from the lungs of mice following primary respiratory syncytial virus infection. *Journal of medical virology*. 2006;78(6):829-38.

261. Jordan-Villegas A, Chang M, Khokhar S, Gómez AM, McCracken Jr G, Mejias A, et al. Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection Predisposes Mice to Severe Pneumococcal Disease and Bacteremia. *Infectious Diseases Society of America 48th Annual Meeting 2010*; Friday, October 22, 2010; Vancouver.

262. Madhi SA, Klugman KP, Vaccine Trialist G. A role for *Streptococcus pneumoniae* in virus-associated pneumonia. *Nature medicine*. 2004;10(8):811-3.

263. Kim PE, Musher DM, Glezen WP, Rodriguez-Barradas MC, Nahm WK, Wright CE. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution, and the isolation of respiratory viruses. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1996;22(1):100-6.
264. Ampofo K, Bender J, Sheng X, Korgenski K, Daly J, Pavia AT, et al. Seasonal invasive pneumococcal disease in children: role of preceding respiratory viral infection. *Pediatrics*. 2008;122(2):229-37.
265. Talbot TR, Poehling KA, Hartert TV, Arbogast PG, Halasa NB, Edwards KM, et al. Seasonality of invasive pneumococcal disease: temporal relation to documented influenza and respiratory syncytial viral circulation. *The American journal of medicine*. 2005;118(3):285-91.
266. Jansen AG, Sanders EA, A VDE, AM VANL, Hoes AW, Hak E. Invasive pneumococcal and meningococcal disease: association with influenza virus and respiratory syncytial virus activity? *Epidemiology and infection*. 2008;136(11):1448-54.
267. Murphy TF, Henderson FW, Clyde WA, Jr., Collier AM, Denny FW. Pneumonia: an eleven-year study in a pediatric practice. *American journal of epidemiology*. 1981;113(1):12-21.
268. Weinberger DM, Grant LR, Steiner CA, Weatherholtz R, Santosham M, Viboud C, et al. Seasonal drivers of pneumococcal disease incidence: impact of bacterial carriage and viral activity. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014;58(2):188-94.
269. Weinberger DM, Klugman KP, Steiner CA, Simonsen L, Viboud C. Association between respiratory syncytial virus activity and pneumococcal disease in infants: a time series analysis of US hospitalization data. *PLoS medicine*. 2015;12(1):e1001776.
270. Kelly MS, Smieja M, Luinstra K, Wirth KE, Goldfarb DM, Steenhoff AP, et al. Association of respiratory viruses with outcomes of severe childhood pneumonia in Botswana. *PloS one*. 2015;10(5):e0126593.
271. Wilks J, Golovkina T. Influence of microbiota on viral infections. *PLoS pathogens*. 2012;8(5):e1002681.

272. Kane M, Case LK, Kopaskie K, Kozlova A, MacDermid C, Chervonsky AV, et al. Successful transmission of a retrovirus depends on the commensal microbiota. *Science*. 2011;334(6053):245-9.
273. Kuss SK, Best GT, Etheredge CA, Pruijssers AJ, Frierson JM, Hooper LV, et al. Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science*. 2011;334(6053):249-52.
274. Lijek RS, Weiser JN. Co-infection subverts mucosal immunity in the upper respiratory tract. *Current opinion in immunology*. 2012;24(4):417-23.
275. Bisgaard H, Hermansen MN, Bonnelykke K, Stokholm J, Baty F, Skytt NL, et al. Association of bacteria and viruses with wheezy episodes in young children: prospective birth cohort study. *Bmj*. 2010;341:c4978.
276. Vissing NH, Chawes BL, Bisgaard H. Increased risk of pneumonia and bronchiolitis after bacterial colonization of the airways as neonates. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;188(10):1246-52.
277. von Linstow ML, Schonning K, Hoegh AM, Sevelsted A, Vissing NH, Bisgaard H. Neonatal airway colonization is associated with troublesome lung symptoms in infants. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;188(8):1041-2.
278. Hishiki H, Ishiwada N, Fukasawa C, Abe K, Hoshino T, Aizawa J, et al. Incidence of bacterial coinfection with respiratory syncytial virus bronchopulmonary infection in pediatric inpatients. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2011;17(1):87-90.
279. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PloS one*. 2010;5(1):e8578.
280. Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsolia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;165(9):1285-9.

281. Ruohola A, Pettigrew MM, Lindholm L, Jalava J, Raisanen KS, Vainionpaa R, et al. Bacterial and viral interactions within the nasopharynx contribute to the risk of acute otitis media. *The Journal of infection*. 2013;66(3):247-54.
282. Tal A, Bavilski C, Yohai D, Bearman JE, Gorodischer R, Moses SW. Dexamethasone and salbutamol in the treatment of acute wheezing in infants. *Pediatrics*. 1983;71(1):13-8.
283. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Bailey WR. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. 12th ed. St. Louis, Mo.: Elsevier Mosby; 2007.
284. Malley R, DeVincenzo J, Ramilo O, Dennehy PH, Meissner HC, Gruber WC, et al. Reduction of respiratory syncytial virus (RSV) in tracheal aspirates in intubated infants by use of humanized monoclonal antibody to RSV F protein. *The Journal of infectious diseases*. 1998;178(6):1555-61.
285. Gill MA, Long K, Kwon T, Muniz L, Mejias A, Connolly J, et al. Differential recruitment of dendritic cells and monocytes to respiratory mucosal sites in children with influenza virus or respiratory syncytial virus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(11):1667-76.
286. Torres JP, Gomez AM, Khokhar S, Bhoj VG, Tagliabue C, Chang ML, et al. Respiratory syncytial virus (RSV) RNA loads in peripheral blood correlates with disease severity in mice. *Respiratory research*. 2010;11:125.
287. Hall MW, Gavrillin MA, Knatz NL, Duncan MD, Fernandez SA, Wewers MD. Monocyte mRNA phenotype and adverse outcomes from pediatric multiple organ dysfunction syndrome. *Pediatric research*. 2007;62(5):597-603.
288. Hall CB, Powell KR, Schnabel KC, Gala CL, Pincus PH. Risk of secondary bacterial infection in infants hospitalized with respiratory syncytial viral infection. *The Journal of pediatrics*. 1988;113(2):266-71.
289. Purcell K, Fergie J. Concurrent serious bacterial infections in 2396 infants and children hospitalized with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 2002;156(4):322-4.

290. Ralston S, Hill V, Waters A. Occult serious bacterial infection in infants younger than 60 to 90 days with bronchiolitis: a systematic review. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 2011;165(10):951-6.
291. Titus MO, Wright SW. Prevalence of serious bacterial infections in febrile infants with respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics*. 2003;112(2):282-4.
292. Hendaus MA, Alhammadi AH, Khalifa MS, Muneer E, Chandra P. Risk of urinary tract infection in infants and children with acute bronchiolitis. *Paediatrics & child health*. 2015;20(5):e25-9.
293. Kaluarachchi D, Kaldas V, Roques E, Nunez R, Mendez M. Comparison of urinary tract infection rates among 2- to 12-month-old febrile infants with RSV infections using 1999 and 2011 AAP diagnostic criteria. *Clinical pediatrics*. 2014;53(8):742-6.
294. Kaluarachchi D, Kaldas V, Erickson E, Nunez R, Mendez M. When to perform urine cultures in respiratory syncytial virus-positive febrile older infants? *Pediatric emergency care*. 2014;30(9):598-601.
295. Levine DA, Platt SL, Dayan PS, Macias CG, Zorc JJ, Krief W, et al. Risk of serious bacterial infection in young febrile infants with respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics*. 2004;113(6):1728-34.
296. American Academy of Pediatrics Subcommittee on D, Management of B. Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics*. 2006;118(4):1774-93.
297. Esposito S, Marchese A, Tozzi AE, Rossi GA, Da Dalt L, Bona G, et al. Bacteremic pneumococcal community-acquired pneumonia in children less than 5 years of age in Italy. *The Pediatric infectious disease journal*. 2012;31(7):705-10.
298. Shah SS, Alpern ER, Zwerling L, McGowan KL, Bell LM. Risk of bacteremia in young children with pneumonia treated as outpatients. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 2003;157(4):389-92.
299. Resti M, Moriondo M, Cortimiglia M, Indolfi G, Canessa C, Becciolini L, et al. Community-acquired bacteremic pneumococcal pneumonia in children: diagnosis and serotyping by real-time polymerase chain reaction using blood samples. *Clinical*

infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2010;51(9):1042-9.

300. Iroh Tam PY, Bernstein E, Ma X, Ferrieri P. Blood Culture in Evaluation of Pediatric Community-Acquired Pneumonia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Hospital pediatrics*. 2015;5(6):324-36.

301. Heine D, Cochran C, Moore M, Titus MO, Andrews AL. The prevalence of bacteremia in pediatric patients with community-acquired pneumonia: guidelines to reduce the frequency of obtaining blood cultures. *Hospital pediatrics*. 2013;3(2):92-6.

302. Dennehy PH. Community-acquired pneumonia in children. *Medicine and health, Rhode Island*. 2010;93(7):211-5.

303. McCracken GH, Jr. Etiology and treatment of pneumonia. *The Pediatric infectious disease journal*. 2000;19(4):373-7.

304. Kneyber MC, Blusse van Oud-Alblas H, van Vliet M, Uiterwaal CS, Kimpen JL, van Vught AJ. Concurrent bacterial infection and prolonged mechanical ventilation in infants with respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. *Intensive care medicine*. 2005;31(5):680-5.

305. Randolph AG, Reder L, Englund JA. Risk of bacterial infection in previously healthy respiratory syncytial virus-infected young children admitted to the intensive care unit. *The Pediatric infectious disease journal*. 2004;23(11):990-4.

306. Thorburn K, Harigopal S, Reddy V, Taylor N, van Saene HK. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax*. 2006;61(7):611-5.

307. Howie SR, Morris GA, Tokarz R, Ebruke BE, Machuka EM, Ideh RC, et al. Etiology of severe childhood pneumonia in the gambia, West Africa, determined by conventional and molecular microbiological analyses of lung and pleural aspirate samples. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014;59(5):682-5.

308. De Schutter I, De Wachter E, Crokaert F, Verhaegen J, Soetens O, Pierard D, et al. Microbiology of bronchoalveolar lavage fluid in children with acute nonresponding or

recurrent community-acquired pneumonia: identification of nontypeable *Haemophilus influenzae* as a major pathogen. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;52(12):1437-44.

309. Levin D, Tribuzio M, Green-Wrzesinski T, Ames B, Radwan S, Jarvis JD, et al. Empiric antibiotics are justified for infants with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection presenting with respiratory failure: a prospective study and evidence review. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*. 2010;11(3):390-5.

310. Mella C, Mejias A, Muszynski J, Hall M, Ramilo O. Relationship Between Viral Pathogen, Bacterial co-infection, and Outcomes from Bronchiolitis in Critically Ill Children. *Society of Critical Care Medicine Annual Congress, San Diego, CA Abstract # 3562*. January 2011.

311. Patel JA, Nguyen DT, Revai K, Chonmaitree T. Role of respiratory syncytial virus in acute otitis media: implications for vaccine development. *Vaccine*. 2007;25(9):1683-9.

312. Andrade MA, Hoberman A, Glustein J, Paradise JL, Wald ER. Acute otitis media in children with bronchiolitis. *Pediatrics*. 1998;101(4 Pt 1):617-9.

313. Gomaa MA, Galal O, Mahmoud MS. Risk of acute otitis media in relation to acute bronchiolitis in children. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2012;76(1):49-51.

314. Chonmaitree T, Heikkinen T. Viruses and acute otitis media. *The Pediatric infectious disease journal*. 2000;19(10):1005-7.

315. Verhoeven D, Xu Q, Pichichero ME. Differential impact of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus on the frequency of acute otitis media is explained by lower adaptive and innate immune responses in otitis-prone children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014;59(3):376-83.

316. Pettigrew MM, Gent JF, Pyles RB, Miller AL, Nokso-Koivisto J, Chonmaitree T. Viral-bacterial interactions and risk of acute otitis media complicating upper respiratory tract infection. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(11):3750-5.

317. Chonmaitree T, Alvarez-Fernandez P, Jennings K, Trujillo R, Marom T, Loeffelholz MJ, et al. Symptomatic and asymptomatic respiratory viral infections in the first year of life: association with acute otitis media development. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015;60(1):1-9.
318. Kristjansson S, Skuladottir HE, Sturludottir M, Wennergren G. Increased prevalence of otitis media following respiratory syncytial virus infection. *Acta paediatrica*. 2010;99(6):867-70.
319. Brockson ME, Novotny LA, Jurcisek JA, McGillivray G, Bowers MR, Bakaletz LO. Respiratory syncytial virus promotes *Moraxella catarrhalis*-induced ascending experimental otitis media. *PloS one*. 2012;7(6):e40088.
320. Bakaletz LO. Viral potentiation of bacterial superinfection of the respiratory tract. *Trends in microbiology*. 1995;3(3):110-4.
321. Ruuskanen O, Arola M, Putto-Laurila A, Mertsola J, Meurman O, Viljanen MK, et al. Acute otitis media and respiratory virus infections. *The Pediatric infectious disease journal*. 1989;8(2):94-9.
322. Chonmaitree T, Revai K, Grady JJ, Clos A, Patel JA, Nair S, et al. Viral upper respiratory tract infection and otitis media complication in young children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46(6):815-23.
323. Alper CM, Winther B, Mandel EM, Hendley JO, Doyle WJ. Rate of concurrent otitis media in upper respiratory tract infections with specific viruses. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2009;135(1):17-21.
324. Vesa S, Kleemola M, Blomqvist S, Takala A, Kilpi T, Hovi T. Epidemiology of documented viral respiratory infections and acute otitis media in a cohort of children followed from two to twenty-four months of age. *The Pediatric infectious disease journal*. 2001;20(6):574-81.
325. Shazberg G, Revel-Vilk S, Shoseyov D, Ben-Ami A, Klar A, Hurvitz H. The clinical course of bronchiolitis associated with acute otitis media. *Archives of disease in childhood*. 2000;83(4):317-9.



326. Faden H, Stanievich J, Brodsky L, Bernstein J, Ogra PL. Changes in nasopharyngeal flora during otitis media of childhood. *The Pediatric infectious disease journal*. 1990;9(9):623-6.
327. Laufer AS, Metlay JP, Gent JF, Fennie KP, Kong Y, Pettigrew MM. Microbial communities of the upper respiratory tract and otitis media in children. *mBio*. 2011;2(1):e00245-10.
328. Hilty M, Qi W, Brugger SD, Frei L, Agyeman P, Frey PM, et al. Nasopharyngeal microbiota in infants with acute otitis media. *The Journal of infectious diseases*. 2012;205(7):1048-55.
329. Behrendt CE, Decker MD, Burch DJ, Watson PH. International variation in the management of infants hospitalized with respiratory syncytial virus. *International RSV Study Group. European journal of pediatrics*. 1998;157(3):215-20.
330. Spurling GK, Doust J, Del Mar CB, Eriksson L. Antibiotics for bronchiolitis in children. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2011(6):CD005189.
331. Svensson C, Berg K, Sigurs N, Trollfors B. Incidence, risk factors and hospital burden in children under five years of age hospitalised with respiratory syncytial virus infections. *Acta paediatrica*. 2015;104(9):922-6.
332. Collard Borsotti MV, Moreno LB, Bujedo E, Marques I, Mosca L, Ferreira Soaje P, et al. [Antibiotics prescription in infants hospitalized with respiratory syncytial virus pneumonia]. *Archivos argentinos de pediatría*. 2008;106(6):515-7.
333. Ralston S, Comick A, Nichols E, Parker D, Lanter P. Effectiveness of quality improvement in hospitalization for bronchiolitis: a systematic review. *Pediatrics*. 2014;134(3):571-81.
334. Florin TA, Byczkowski T, Ruddy RM, Zorc JJ, Test M, Shah SS. Variation in the management of infants hospitalized for bronchiolitis persists after the 2006 American Academy of Pediatrics bronchiolitis guidelines. *The Journal of pediatrics*. 2014;165(4):786-92 e1.

335. Mittal V, Darnell C, Walsh B, Mehta A, Badawy M, Morse R, et al. Inpatient bronchiolitis guideline implementation and resource utilization. *Pediatrics*. 2014;133(3):e730-7.
336. Wilson SD, Dahl BB, Wells RD. An evidence-based clinical pathway for bronchiolitis safely reduces antibiotic overuse. *American journal of medical quality : the official journal of the American College of Medical Quality*. 2002;17(5):195-9.
337. Akenroye AT, Baskin MN, Samnaliev M, Stack AM. Impact of a bronchiolitis guideline on ED resource use and cost: a segmented time-series analysis. *Pediatrics*. 2014;133(1):e227-34.
338. Johnson LW, Robles J, Hudgins A, Osburn S, Martin D, Thompson A. Management of bronchiolitis in the emergency department: impact of evidence-based guidelines? *Pediatrics*. 2013;131 Suppl 1:S103-9.
339. Parikh K, Hall M, Teach SJ. Bronchiolitis management before and after the AAP guidelines. *Pediatrics*. 2014;133(1):e1-7.
340. Friis B, Andersen P, Brenoe E, Hornsleth A, Jensen A, Knudsen FU, et al. Antibiotic treatment of pneumonia and bronchiolitis. A prospective randomised study. *Archives of disease in childhood*. 1984;59(11):1038-45.
341. Greenes DS, Harper MB. Low risk of bacteremia in febrile children with recognizable viral syndromes. *The Pediatric infectious disease journal*. 1999;18(3):258-61.
342. Field CM, Connolly JH, Murtagh G, Slattery CM, Turkington EE. Antibiotic treatment of epidemic bronchiolitis--a double-blind trial. *British medical journal*. 1966;1(5479):83-5.
343. Farley R, Spurling GK, Eriksson L, Del Mar CB. Antibiotics for bronchiolitis in children under two years of age. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014;10:CD005189.
344. McCulloh RJ, Smitherman SE, Koehn KL, Alverson BK. Assessing the impact of national guidelines on the management of children hospitalized for acute bronchiolitis. *Pediatric pulmonology*. 2014;49(7):688-94.

345. Ralston S, Garber M, Narang S, Shen M, Pate B, Pope J, et al. Decreasing unnecessary utilization in acute bronchiolitis care: results from the value in inpatient pediatrics network. *Journal of hospital medicine*. 2013;8(1):25-30.
346. Todd J, Bertoch D, Dolan S. Use of a large national database for comparative evaluation of the effect of a bronchiolitis/viral pneumonia clinical care guideline on patient outcome and resource utilization. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 2002;156(11):1086-90.
347. Baraldi E, Lanari M, Manzoni P, Rossi GA, Vandini S, Rimini A, et al. Inter-society consensus document on treatment and prevention of bronchiolitis in newborns and infants. *Italian journal of pediatrics*. 2014;40:65.
348. Thibeault R, Gilca R, Cote S, De Serres G, Boivin G, Dery P. Antibiotic use in children is not influenced by the result of rapid antigen detection test for the respiratory syncytial virus. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007;39(3):169-74.
349. Schroeder AR, Mansbach JM. Recent evidence on the management of bronchiolitis. *Current opinion in pediatrics*. 2014;26(3):328-33.
350. Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet Infectious diseases*. 2001;1(2):101-14.
351. Pettigrew MM, Laufer AS, Gent JF, Kong Y, Fennie KP, Metlay JP. Upper respiratory tract microbial communities, acute otitis media pathogens, and antibiotic use in healthy and sick children. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(17):6262-70.
352. Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):250-6.
353. Cohen R, Bingen E, Varon E, de La Rocque F, Brahimi N, Levy C, et al. Change in nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* resulting from antibiotic therapy for acute otitis media in children. *The Pediatric infectious disease journal*. 1997;16(6):555-60.

354. Regev-Yochay G, Dagan R, Raz M, Carmeli Y, Shainberg B, Derazne E, et al. Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in Children. *Jama*. 2004;292(6):716-20.
355. Ghaffar F, Muniz LS, Katz K, Reynolds J, Smith JL, Davis P, et al. Effects of amoxicillin/clavulanate or azithromycin on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in children with acute otitis media. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2000;31(4):875-80.
356. Goldwater PN. Effect of cefotaxime or ceftriaxone treatment on nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* type b colonization in children. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995;39(9):2150-2.
357. Alfayate-Miguel S, Ruiz-Gomez J, Fenoll-Comes A, Sanchez-Solis-de Querol M, Iofrio-de Arce A, Casquet-Barcelo A, et al. [Epidemiological study of nasopharyngeal carriers of *Streptococcus pneumoniae* in children in Murcia region]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2014;32(7):434-40.
358. Varon E, Levy C, De La Rocque F, Boucherat M, Deforche D, Podglajen I, et al. Impact of antimicrobial therapy on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Branhamella catarrhalis* in children with respiratory tract infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2000;31(2):477-81.
359. Dagan R, Leibovitz E, Greenberg D, Yagupsky P, Fliss DM, Leiberman A. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal colonization during the first days of antibiotic treatment in pediatric patients. *The Pediatric infectious disease journal*. 1998;17(10):880-5.
360. Konno M, Baba S, Mikawa H, Hara K, Matsumoto F, Kaga K, et al. Study of nasopharyngeal bacterial flora. Second report. Variations in nasopharyngeal bacterial flora in children aged 6 years or younger when administered antimicrobial agents. Part 2. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2006;12(5):305-30.

361. Heikkinen T, Saeed KA, McCormick DP, Baldwin C, Reisner BS, Chonmaitree T. A single intramuscular dose of ceftriaxone changes nasopharyngeal bacterial flora in children with acute otitis media. *Acta paediatrica*. 2000;89(11):1316-21.
362. Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Yagupsky P. Nasopharyngeal colonization in southern Israel with antibiotic-resistant pneumococci during the first 2 years of life: relation to serotypes likely to be included in pneumococcal conjugate vaccines. *The Journal of infectious diseases*. 1996;174(6):1352-5.
363. Bogaert D, Keijser B, Huse S, Rossen J, Veenhoven R, van Gils E, et al. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis. *PloS one*. 2011;6(2):e17035.
364. Xu Q, Almudervar A, Casey JR, Pichichero ME. Nasopharyngeal bacterial interactions in children. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(11):1738-45.
365. Abdullahi O, Nyiro J, Lewa P, Slack M, Scott JA. The descriptive epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* nasopharyngeal carriage in children and adults in Kilifi district, Kenya. *The Pediatric infectious disease journal*. 2008;27(1):59-64.
366. Skevaki CL, Tsiakta P, Trochoutsou AI, Logotheti I, Makrinioti H, Taka S, et al. Associations between Viral and Bacterial Potential Pathogens in the Nasopharynx of Children with and Without Respiratory Symptoms. *The Pediatric infectious disease journal*. 2015.
367. Vu HT, Yoshida LM, Suzuki M, Nguyen HA, Nguyen CD, Nguyen AT, et al. Association between nasopharyngeal load of *Streptococcus pneumoniae*, viral coinfection, and radiologically confirmed pneumonia in Vietnamese children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2011;30(1):11-8.
368. Dhoubhadel BG, Yoshida LM, Nguyen HAT, Minh LN, Le TH, Yasunami M, et al. Bacterial load and multiple-serotype colonization of pneumococcus in a case-control study of pneumonia in Vietnam. *Respirology*. 2013;18 SUPPL. 4(53-)
369. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(7):962-70.

370. O'Brien KL, Walters MI, Sellman J, Quinlisk P, Regnery H, Schwartz B, et al. Severe pneumococcal pneumonia in previously healthy children: the role of preceding influenza infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2000;30(5):784-9.
371. Murdoch DR, Jennings LC. Association of respiratory virus activity and environmental factors with the incidence of invasive pneumococcal disease. *The Journal of infection*. 2009;58(1):37-46.
372. Watson M, Gilmour R, Menzies R, Ferson M, McIntyre P, New South Wales Pneumococcal N. The association of respiratory viruses, temperature, and other climatic parameters with the incidence of invasive pneumococcal disease in Sydney, Australia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006;42(2):211-5.
373. Esposito S, Zampiero A, Terranova L, Ierardi V, Ascolese B, Daleno C, et al. Pneumococcal bacterial load colonization as a marker of mixed infection in children with alveolar community-acquired pneumonia and respiratory syncytial virus or rhinovirus infection. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(11):1199-204.
374. Suarez-Arrabal MC, Mella C, Lopez SM, Brown NV, Hall MW, Hammond S, et al. Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Journal of infection*. 2015;71(4):458-69.
375. Case definitions for pneumococcal syndromes and other severe bacterial infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;48 Suppl 2:S197-202.
376. Jose RJ, Williams AE, Mercer PF, Sulikowski MG, Brown JS, Chambers RC. Regulation of neutrophilic inflammation by proteinase-activated receptor 1 during bacterial pulmonary infection. *Journal of immunology*. 2015;194(12):6024-34.
377. Choi SH, Hong SB, Hong HL, Kim SH, Huh JW, Sung H, et al. Usefulness of cellular analysis of bronchoalveolar lavage fluid for predicting the etiology of pneumonia in critically ill patients. *PloS one*. 2014;9(5):e97346.

378. Melin M, Vuorela A, Salo H, Vaarala O. Respiratory epithelial cells mediate distinct inflammatory responses to different bacterial pathogens. *Immunology* 2012. p. (314-).
379. Folsgaard NV, Schjorring S, Chawes BL, Rasmussen MA, Krogfelt KA, Brix S, et al. Pathogenic bacteria colonizing the airways in asymptomatic neonates stimulates topical inflammatory mediator release. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;187(6):589-95.
380. Lindberg K, Rynnel-Dagoo B, Sundqvist KG. Cytokines in nasopharyngeal secretions; evidence for defective IL-1 beta production in children with recurrent episodes of acute otitis media. *Clinical and experimental immunology*. 1994;97(3):396-402.
381. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature medicine*. 2008;14(3):275-81.
382. Wang W, Zhou A, Zhang X, Xiang Y, Huang Y, Wang L, et al. Interleukin 17A promotes pneumococcal clearance by recruiting neutrophils and inducing apoptosis through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism in acute otitis media. *Infection and immunity*. 2014;82(6):2368-77.
383. Honkinen M, Lahti E, Osterback R, Ruuskanen O, Waris M. Viruses and bacteria in sputum samples of children with community-acquired pneumonia. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(3):300-7.
384. Fukutani KF, Nascimento-Carvalho CM, Van der Gucht W, Wollants E, Khouri R, Dierckx T, et al. Pathogen transcriptional profile in nasopharyngeal aspirates of children with acute respiratory tract infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2015;69:190-6.
385. Sakwinska O, Bastic Schmid V, Berger B, Bruttin A, Keitel K, Lepage M, et al. Nasopharyngeal microbiota in healthy children and pneumonia patients. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(5):1590-4.

386. Greenberg D, Givon-Lavi N, Newman N, Bar-Ziv J, Dagan R. Nasopharyngeal carriage of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes during pediatric pneumonia as a means to estimate serotype disease potential. *The Pediatric infectious disease journal*. 2011;30(3):227-33.
387. Albrich WC, Madhi SA, Adrian PV, van Niekerk N, Mareletsi T, Cutland C, et al. Use of a rapid test of pneumococcal colonization density to diagnose pneumococcal pneumonia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;54(5):601-9.
388. Cuquemelle E, Soulis F, Villers D, Roche-Campo F, Ara Somohano C, Fartoukh M, et al. Can procalcitonin help identify associated bacterial infection in patients with severe influenza pneumonia? A multicentre study. *Intensive care medicine*. 2011;37(5):796-800.
389. Sangil A, Calbo E, Robles A, Benet S, Viladot ME, Pascual V, et al. Aetiology of community-acquired pneumonia among adults in an H1N1 pandemic year: the role of respiratory viruses. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2012;31(10):2765-72.
390. Toikka P, Irjala K, Juven T, Virkki R, Mertsola J, Leinonen M, et al. Serum procalcitonin, C-reactive protein and interleukin-6 for distinguishing bacterial and viral pneumonia in children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2000;19(7):598-602.
391. Moulin F, Raymond J, Lorrot M, Marc E, Coste J, Iniguez JL, et al. Procalcitonin in children admitted to hospital with community acquired pneumonia. *Archives of disease in childhood*. 2001;84(4):332-6.
392. Schutzle H, Forster J, Superti-Furga A, Berner R. Is serum procalcitonin a reliable diagnostic marker in children with acute respiratory tract infections? A retrospective analysis. *European journal of pediatrics*. 2009;168(9):1117-24.
393. Don M, Valent F, Korppi M, Falletti E, De Candia A, Fasoli L, et al. Efficacy of serum procalcitonin in evaluating severity of community-acquired pneumonia in childhood. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2007;39(2):129-37.



394. Lee JY, Hwang SJ, Shim JW, Jung HL, Park MS, Woo HY, et al. Clinical significance of serum procalcitonin in patients with community-acquired lobar pneumonia. *The Korean journal of laboratory medicine*. 2010;30(4):406-13.
395. Korppi M. Non-specific diagnosis of bacterial pneumonia in children. *European journal of pediatrics*. 2011;170(1):131; author reply 3.
396. Gilbert DN. Use of plasma procalcitonin levels as an adjunct to clinical microbiology. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(7):2325-9.
397. Biron BM, Ayala A, Lomas-Neira JL. Biomarkers for Sepsis: What Is and What Might Be? *Biomarker insights*. 2015;10(Suppl 4):7-17.
398. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clinical microbiology reviews*. 2012;25(4):609-34.
399. Storch GA. Plethora of Respiratory Viruses and Respiratory Virus Data. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015.
400. Shah SS, Ambroggio L, Florin TA. Biomarkers for Predicting Illness Severity in Children With Acute Lower Respiratory Tract Infections. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2015;4(3):189-91.
401. Suarez NM, Bunsow E, Falsey AR, Walsh EE, Mejias A, Ramilo O. Superiority of transcriptional profiling over procalcitonin for distinguishing bacterial from viral lower respiratory tract infections in hospitalized adults. *The Journal of infectious diseases*. 2015;212(2):213-22.
402. Hu X, Yu J, Crosby SD, Storch GA. Gene expression profiles in febrile children with defined viral and bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(31):12792-7.
403. Zaas AK, Chen M, Varkey J, Veldman T, Hero AO, 3rd, Lucas J, et al. Gene expression signatures diagnose influenza and other symptomatic respiratory viral infections in humans. *Cell host & microbe*. 2009;6(3):207-17.

404. Zaas AK, Burke T, Chen M, McClain M, Nicholson B, Veldman T, et al. A host-based RT-PCR gene expression signature to identify acute respiratory viral infection. *Science translational medicine*. 2013;5(203):203ra126.
405. Ramilo O, Allman W, Chung W, Mejias A, Ardura M, Glaser C, et al. Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections. *Blood*. 2007;109(5):2066-77.
406. Ramilo O, Mejias A. Shifting the paradigm: host gene signatures for diagnosis of infectious diseases. *Cell host & microbe*. 2009;6(3):199-200.
407. Heinonen S, Jartti T, Garcia C, Oliva S, Smitherman C, Anguiano E, et al. Rhinovirus Detection in Symptomatic and Asymptomatic Children: Value of Host Transcriptome Analysis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (AJRCCM)* 2015 (in press).
408. Odutola A, Antonio M, Owolabi O, Bojang A, Foster-Nyarko E, Donkor S, et al. Comparison of the prevalence of common bacterial pathogens in the oropharynx and nasopharynx of gambian infants. *PloS one*. 2013;8(9):e75558.
409. Vissers M, de Groot R, Ferwerda G. Severe viral respiratory infections: are bugs bugging? *Mucosal immunology*. 2014;7(2):227-38.
410. Hare KM, Grimwood K, Leach AJ, Smith-Vaughan H, Torzillo PJ, Morris PS, et al. Respiratory bacterial pathogens in the nasopharynx and lower airways of Australian indigenous children with bronchiectasis. *The Journal of pediatrics*. 2010;157(6):1001-5.
411. Mainz JG, Naehrlich L, Schien M, Kading M, Schiller I, Mayr S, et al. Concordant genotype of upper and lower airways *P aeruginosa* and *S aureus* isolates in cystic fibrosis. *Thorax*. 2009;64(6):535-40.

\*Diseño de la portada y la contraportada: María del Carmen Suárez Arrabal. Fotos obtenidas de pixabay.com, webconsultas.com (libre acceso) y fotos ID#:2175 (RSV TEM), ID#:3643 (RSV indirect immunofluorescence) e ID#:9996 (*S. pneumoniae* SEM), por cortesía de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades-CDC-de los EE.UU. (<http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>)